

Alma Mater Studiorum
Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN EPIDEMIOLOGIA E
CONTROLLO DELLE ZOONOSI XIX CICLO**

Coordinatore Prof. Luigi Morganti

**VIRUS DELLA DIARREA VIRALE BOVINA:
VARIABILITA' GENETICA E ASPETTI
IMMUNOLOGICI**

Dottorando:
Dr. Elena Galletti

Docente guida:
Prof. Santino Prosperi

Coordinatore:
Prof. Luigi Morganti

Settore Scientifico Disciplinare: VET/05

Marzo 2007
Sede Amministrativa:
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Bologna

agli Invincibili

INDICE

INTRODUZIONE	1
SEZIONE GENERALE	
1	EZIOLOGIA 4
1.1	Inquadramento tassonomico 4
1.2	Morfologia 6
1.3	Caratteristiche fisico-chimiche 7
1.3.1	Caratteristiche fisiche 7
1.3.2	Composizione chimica 8
1.3.2.1	Acido nucleico 8
1.3.2.2	Proteine 8
1.3.2.3	Lipidi 14
1.3.2.4	Glucidi 14
1.3.3	Resistenza agli agenti fisici e chimici 15
1.4	Organizzazione del genoma 15
1.5	Proprietà antigeniche 18
1.6	Ciclo di replicazione virale 18
1.6.1	Adsorbimento e penetrazione 19
1.6.2	Traduzione dei geni 21
1.6.3	Sintesi proteica 21
1.6.4	Replicazione del genoma virale 22
1.6.5	Assemblaggio e gemmazione 25
1.7	Caratteristiche biologiche 25
1.7.1	Crescita su colture cellulari 25
1.7.2	Fenomeno dell'interferenza omologa ed eterologa 27
1.7.3	Effetto E.N.D. (esaltazione del virus di New Castle) 28
1.7.4	Ospiti sperimentali 28
2	EPIDEMIOLOGIA 29

2.1	<i>Diffusione geografica</i>	29
2.1.1	<i>Situazione in Italia</i>	30
2.2	<i>Recettività</i>	31
2.2.1	<i>Bovini</i>	31
2.2.2	<i>Altri ruminanti domestici</i>	32
2.2.3	<i>Altre specie domestiche</i>	32
2.2.4	<i>Animali selvatici o in cattività</i>	33
2.2.5	<i>Uomo</i>	35
2.3	<i>Modalità di trasmissione</i>	35
2.3.1	<i>Trasmissione orizzontale</i>	35
2.3.2	<i>Trasmissione verticale</i>	37
2.4	<i>Epidemiologia molecolare della BVD-MD</i>	37
3	PATOGENESI	42
3.1	<i>Patogenesi della forma acuta</i>	42
3.1.1	<i>Riduzione delle difese immunitarie</i>	42
3.1.2	<i>Patogenesi della forma gastroenterica</i>	43
3.1.3	<i>Infezione acuta e patologia respiratoria</i>	44
3.1.4	<i>Infezione acuta e turbe della riproduzione</i>	45
3.1.4.1	<i>Maschio</i>	45
3.1.4.2	<i>Bovina non gravida</i>	46
3.1.4.3	<i>Bovina gravida</i>	47
3.2	<i>BVDV 2 e sindrome emorragica</i>	52
3.3	<i>Malattia delle Mucose</i>	53
4	QUASISPECIE VIRALE E VARIBILITA' GENETICA	56
4.1	<i>La quasispecie virale</i>	56
4.2	<i>La quasispecie virale nel BVDV</i>	61
5	SINTOMATOLOGIA	64
5.1	<i>Forma subclinica</i>	64
5.2	<i>Forma acuta</i>	64
5.3	<i>Forma acuta nella bovina gravida</i>	65
5.4	<i>Forma emorragica</i>	66

5.5	<i>Malattia delle Mucose</i>	67
5.5.1	<i>Forma acuta</i>	67
5.5.2	<i>Forma cronica</i>	71
6	LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE	72
6.1	<i>Lesioni nella diarrea virale bovina</i>	72
6.1.1	<i>Forma acuta</i>	72
6.1.2	<i>Forma emorragica</i>	72
6.1.3	<i>Lesioni da infezione congenita</i>	73
6.2	<i>Lesioni nella malattia delle mucose</i>	74
6.2.1	<i>Cavità orale ed esofago</i>	74
6.2.2	<i>Prestomaci e abomaso</i>	75
6.2.3	<i>Intestino</i>	77
6.2.4	<i>Sistema immunoemopoietico</i>	79
6.2.5	<i>Cute</i>	79
6.3	<i>Esame microscopico</i>	80
7	IMMUNITA'	82
7.1	<i>La risposta immunitaria durante l'infezione virale</i>	82
7.2	<i>La risposta immunitaria nei confronti del BVDV</i>	87
8	DIAGNOSI	95
8.1	<i>Diagnosi clinica e anatomo-patologica</i>	95
8.2	<i>Diagnosi differenziale</i>	96
8.2.1	<i>forma gastroenterica</i>	96
8.2.2	<i>forma respiratoria</i>	97
8.2.3	<i>forma riproduttiva</i>	98
8.2.4	<i>forma emorragica</i>	98
8.2.5	<i>forma nervosa</i>	99
8.3	<i>Diagnosi di laboratorio</i>	99
8.3.1	<i>Diagnosi indiretta</i>	99
8.3.2	<i>Diagnosi diretta</i>	101
9	CONTROLLO	107
9.1	<i>Profilassi diretta</i>	107

9.2	<i>Profilassi indiretta</i>	108
9.2.1	<i>Vaccini</i>	108
9.3	<i>Terapia</i>	115
9.3.1	<i>Terapie antivirali</i>	116

SEZIONE SPERIMENTALE

1	INDAGINE SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL BVDV	119
1.1	<i>Materiali e metodi</i>	119
1.1.1	<i>Animali e Virus</i>	119
1.1.2	<i>Estrazione dell'RNA</i>	120
1.1.3	<i>RT-PCR</i>	120
1.1.4	<i>Sequenziamento e analisi filogenetica</i>	121
1.2	<i>Risultati</i>	124
1.2.1	<i>Animali</i>	124
1.2.2	<i>Amplificazione genetica e caratterizzazione</i>	125
2	STUDIO SULLA VARIABILITA' GENETICA DEL BVDV	129
2.1	<i>Materiali e metodi</i>	129
2.1.1	<i>Scelta e prelievo dei campioni</i>	129
2.1.2	<i>Estrazione dell'RNA virale, PCR della regione 5'UTR e della regione E2</i>	130
2.1.3	<i>Purificazione dei prodotti della PCR</i>	130
2.1.4	<i>Single-Strand Conformation Polymorphisms (SSCPs)</i>	131
2.1.5	<i>Colorazione argéntica del gel</i>	132
2.1.6	<i>Clonazione</i>	132
2.1.6.1	<i>Produzione dell'amplificato</i>	132
2.1.6.2	<i>Produzione dei cloni</i>	132
2.1.6.3	<i>Sequenziamento e analisi delle mutazioni dei cloni della regione 5'UTR</i>	133
2.2	<i>Risultati</i>	133
2.2.1	<i>Analisi della regione 5'UTR tramite SSCP</i>	133
2.2.2	<i>Analisi della regione E2 tramite SSCP</i>	136
2.2.3	<i>Clonazione</i>	138

2.2.3.1	<i>Analisi della regione 5'UTR dei cloni</i>	138
2.2.3.2	<i>Analisi della regione E2 dei cloni</i>	140
2.2.4	<i>Sequenziamento della regione 5'UTR dei cloni</i>	141
3	ASPETTI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA NEI CONFRONTI DEL BVDV	143
3.1	Materiali e metodi	143
3.1.1	<i>Campioni utilizzati per la quantificazione citochinica e virale in organi di soggetti PI</i>	143
3.1.2	<i>Campioni utilizzati per la valutazione della viremia e dell'espressione citochinica nei linfociti ematici di un soggetto PI</i>	145
3.1.3	<i>Estrazione dell'RNA totale</i>	145
3.1.4	<i>Real Time PCR per la quantificazione del BVDV</i>	146
3.1.5	<i>Quantificazione citochinica</i>	147
3.1.6	<i>Quantificazione dell'housekeeping e normalizzazione</i>	148
3.1.7	<i>Analisi Statistica</i>	148
3.2	Risultati	150
3.2.1	<i>Quantificazione del BVDV in organi di soggetti PI</i>	150
3.2.2	<i>Quantificazione citochimica in organi di soggetti PI</i>	153
3.2.3	<i>Quantificazione del BVDV e delle citochine nel buffy coat di un soggetto PI</i>	156
4	DISCUSSIONE	160
5	CONCLUSIONI	167

INTRODUZIONE

Il virus della Diarrea Virale Bovina è responsabile della Diarrea Virale Bovina/Malattia delle Mucose (BVD/MD) malattia a diffusione mondiale responsabile di gravi perdite economiche in tutti i Paesi dove è praticato l'allevamento dei bovini.

Sebbene la BVD/MD sia una patologia conosciuta da molto tempo, il primo caso venne infatti descritto nel 1946 da Olafson come “un’ apparente nuova malattia trasmissibile dei bovini”, ancora oggi sono molti gli aspetti insoliti di questa patologia.

Dopo la prima segnalazione l'infezione da BVDV è stata evidenziata in molti Paesi associata a diverse manifestazioni cliniche, numerosi studi sono stati condotti per comprendere la relazione tra l'agente eziologico e le diverse forme sintomatologiche.

Il BVDV esiste in natura come quasispecie virale e generando costantemente mutanti si adatta velocemente alla risposta dell'ospite. Le diverse manifestazioni cliniche del virus e i rispettivi processi patogenetici possono essere attribuiti proprio alla variabilità virale (Chaston *et al.*, 2001) ne è un esempio la malattia delle mucose (MD), patologia sporadica caratterizzata da elevata mortalità.

Recentemente l'attenzione della ricerca si è incentrata su aspetti di biologia molecolare, con la caratterizzazione delle proteine virali e della sequenza genomica del BVDV. Queste conoscenze hanno permesso di meglio comprendere la patogenesi della malattia, di sviluppare migliori tecniche diagnostiche e di studiarne l'epidemiologia molecolare (Ridpath *et al.*, 1994). Attualmente gli aspetti del BVDV maggiormente indagati comprendono la variabilità genetica e l'interazione tra il virus e l'ospite con particolare attenzione alla risposta immunitaria innata e acquisita dell'ospite.

Nonostante i numerosi studi la malattia risulta ancora ampiamente diffusa in molti Paesi tra i quali l'Italia. Molti aspetti dell'infezione devono essere ancora chiariti la cui conoscenza è necessaria per il controllo della malattia.

Con il presente lavoro abbiamo quindi voluto approfondire alcuni aspetti del BVDV ed in particolare caratterizzare geneticamente alcuni ceppi circolanti in Italia, valutare la variabilità genetica di ceppi isolati nel corso di infezione persistente o malattia delle mucose e la risposta immunitaria tramite quantificazione dell'espressione di alcune citochine in soggetti persistentemente infetti (PI).

La conoscenza delle varianti genetiche presenti sul territorio è fondamentale ai fini sia di studi di epidemiologia molecolare (Hamers *et al.*, 2001) sia nella scelta dei protocolli vaccinali.

Lo studio sulla eterogenicità genetica è importante per comprendere l'evoluzione del virus e come le mutazioni genomiche influenzino la patogenesi della malattia (Jones *et al.*, 2002). L'analisi delle quasispecie virali nei diversi stadi dell'infezione può essere infatti d'aiuto nella comprensione dell'evoluzione della Diarrea Virale Bovina e Malattia delle Mucose.

L'approfondimento di alcuni aspetti della risposta immunitaria nei confronti dell'infezione persistente da BVDV risulta infine indispensabile per la comprensione dei meccanismi di difesa durante l'infezione e la loro eventuale induzione tramite vaccinazione.

SEZIONE GENERALE

CAPITOLO 1. EZIOLOGIA

1.1 Inquadramento tassonomico

Il virus della diarrea virale bovina (BVDV) appartiene alla famiglia *Flaviviridae*, genere *Pestivirus*. Alla famiglia *Flaviviridae* appartengono anche i generi *Flavivirus* e *Hepacivirus*. All'interno del genere *Pestivirus* oltre al BVDV tipo I e II, si trovano anche il BDV (virus della Border Disease) e il CSFV (virus della Peste Suina Classica) e una provvisoria quinta specie rappresentata da un singolo *Pestivirus* isolato da una giraffa in Kenia più di 30 anni fa (Fauquet *et al.*, 2005) (Fig. 1.1.1).

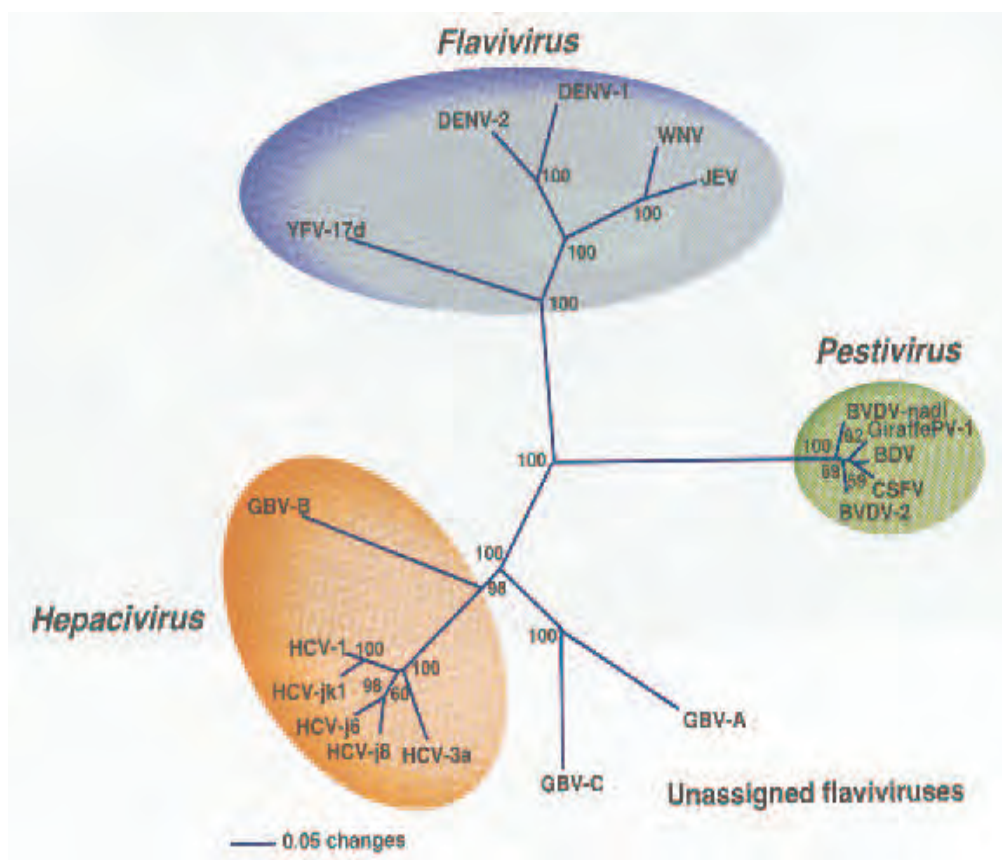


Fig. 1.1.1: Famiglia delle *Flaviviridae* (Fauquet *et al.*, 2005)

I *Pestivirus* sono geneticamente e antigenicamente correlati e non sono strettamente specie-specifici, sebbene all'inizio siano stati classificati in base alla specie ospite. In origine, si classificavano infatti, come PSCV i virus isolati da suini, BVDV quelli isolati da bovini e BDV quelli isolati dagli ovini. Studi successivi hanno dimostrato che i *Pestivirus* non sono ospite specifici. BVDV e BDV sono in grado di infettare un ampio range di ospiti dell'ordine *Artiodactyla*, quali capre, bufali (*Bubalus bubalis*), maiali, cinghiali e cervi (Becher *et al.*, 1997; Giangaspero e Harasawa, 1999; Paton *et al.*, 1995a; Løken, 1995; Nettleton, 1990; Hamers *et al.*, 2001). Il PSCV, invece, è stato isolato solo dal maiale e dal cinghiale, fatto che suggerisce una maggiore specificità per l'ospite di questo virus (Løken, 1995; Giangaspero e Harasawa, 1999).

La scoperta che questi virus non sono ospite-specifici ha reso necessario, ai fini della classificazione, l'utilizzo di metodi che evidenzino le loro caratteristiche antigeniche e genetiche; Paton, e collaboratori hanno messo a punto 76 anticorpi monoclonali (MAbs) diretti verso 9 differenti *Pestivirus* ottenendo, in base all'espressione degli epitopi, quattro principali gruppi:

- Il primo corrisponde al virus della peste suina classica e include la maggior parte dei *Pestivirus* suini.
- Il secondo gruppo contiene i virus di origine bovina ed include i virus di riferimento del BVDV, oltre a virus isolati da suini e pecore.
- Al terzo gruppo appartengono i virus di riferimento della BDV ed alcuni virus isolati da suini.
- Il quarto gruppo, infine, include virus atipici isolati da bovini, pecore e suini.

Tuttavia, questa classificazione non è ben definita, in quanto rimane un *cluster* di ceppi che si trovano in una posizione intermedia tra il sottogruppo BVDV e quello BDV.

Lo stesso risultato si è ottenuto con prove di cross-neutralizzazione (Paton *et al.*, 1995a). Dunque, anche la classificazione su base antigenica dei *Pestivirus* tramite test di cross-neutralizzazione e differenziazione attraverso anticorpi monoclonali non è priva di limiti. Il metodo attualmente più utilizzato, per una corretta classificazione è quello di evidenziare la correlazione genetica tra i virus. Per questo fine, si possono utilizzare diverse porzioni del genoma, quali la 5'UTR (Pellerin *et al.*, 1994; Paton *et al.*, 1995a; Becher *et al.*, 1995, Giangaspero e Harasawa, 2004), la E2 (Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 2003) e la NP^{pro} (Becher *et al.*, 2003).

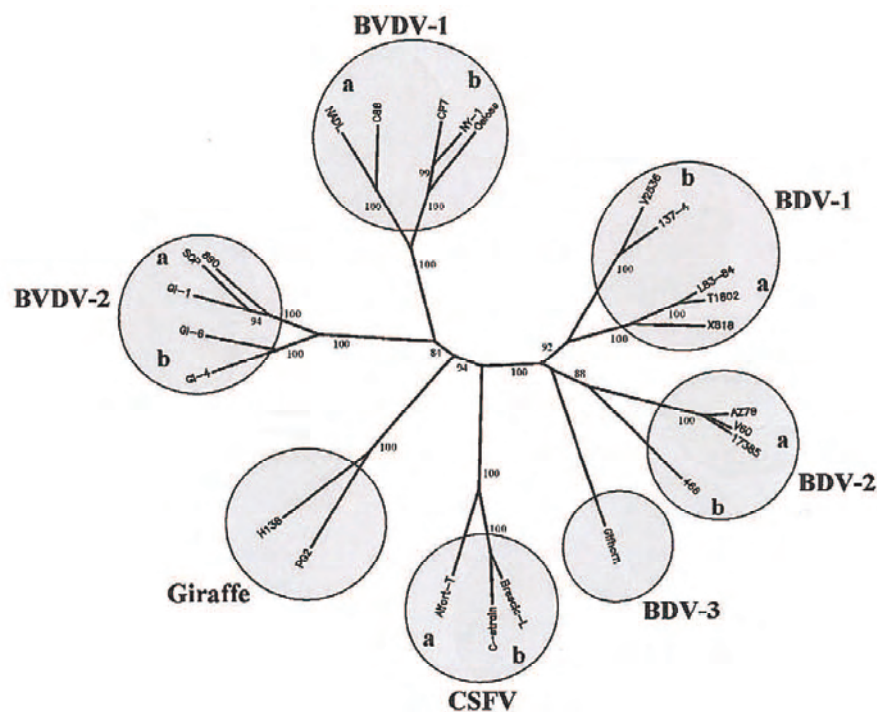


Fig. 1.1.2: Dendrogramma che mostra le relazioni genetiche tra diversi ceppi di Pestivirus. L'albero filogenetico è stato ottenuto sulla base della sequenza N^{pro} (Becher et al., 2003)

Sulla base dell'analisi genetica il BDV, BVDV-1, BVDV-2 e PSCV possono essere divisi ciascuno in sottogruppi o sottogruppi (cfr. capitolo 2.4).

Il BVDV può poi essere diviso in 2 biotipi sulla base della presenza o meno di effetto citopatogeno in colture cellulari infettate con il virus della diarrea virale bovina. I ceppi sono classificati come citopatogeni (cp) o non citopatogeni (ncp) (Castrucci, 1992).

1.2 Morfologia

Il virus della diarrea virale bovina ha un diametro di circa 40-60 nanometri e una forma sferica; è un virus provvisto di envelope sulla cui superficie si trovano subunità a forma di anello del diametro di 10-12 nanometri rappresentate dalle proteine E1 ed E2; si pensa che anche la proteina E0 sia associata all'-envelope ma non è ancora certa la sua

precisa localizzazione (Donis, 1995). Il capside formato dalla proteina C presenta una simmetria cubica (Farina e Scatozza, 1998).

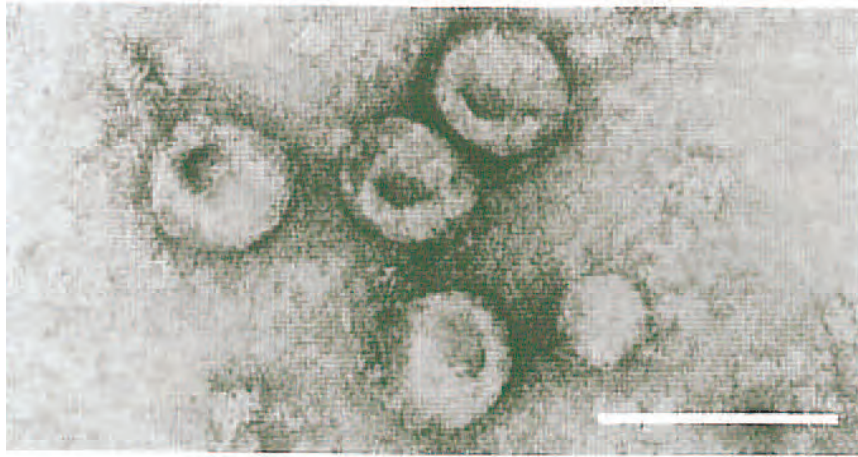


Fig. 1.2.1: Microscopia elettronica a colorazione negativa del BVDV-1 (Fauquet *et al.*, 2005)

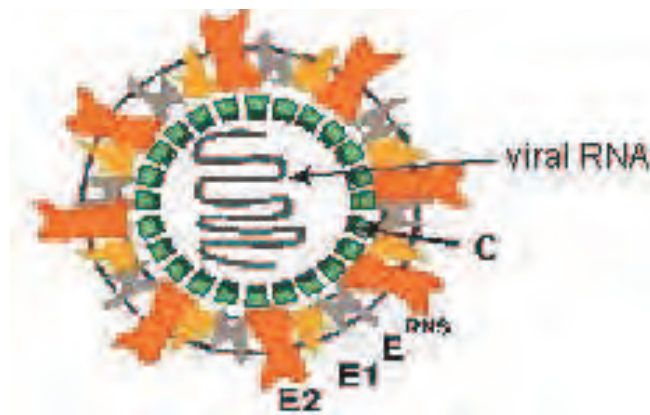


Fig. 1.2.2: Struttura del BVDV

1.3 Caratteristiche fisico-chimiche

1.3.1 Caratteristiche fisiche

La massa relativa (M_r) del virione non è stata determinata con precisione, ma in base alla composizione del virus è stimata di circa 6×10^7 . La densità in saccarosio è $1.10-1.15 \text{ g/cm}^3$; il coefficiente di sedimentazione (S_{20w}) è 140-150S (Fauquet *et al.*, 2005).

1.3.2 Composizione chimica

1.3.2.1 Acido nucleico

Il virione contiene un singolo filamento di RNA a polarità positiva di circa 12.3 kb di lunghezza. Le dimensioni del genoma possono però variare a seconda del biotipo in esame; sono stati infatti evidenziati biotipi citopatogeni di BVDV in cui la lunghezza del genoma è di 8 kb (Tautz *et al.*, 1994) ed altri di 15.2 kb (Becher *et al.*, 1998).

Queste variazioni delle dimensioni del genoma sono da attribuire a delezioni di ampie parti del genoma, inserzioni di sequenze di genoma della cellula infettata, duplicazioni e rimaneggiamenti del genoma virale (Mendez *et al.*, 1998; Beherens *et al.*, 1998).

In tutti i casi, l'RNA genomico contiene una singola open reading frame (ORF) (Fauquet *et al.*, 2005).

La composizione delle basi nucleotidiche dei ceppi standard è la seguente: 32% adenina, 22% timina, 26% guanina, 20% citosina (Donis, 1995).

1.3.2.2 Proteine

***Pestivirus* genome**

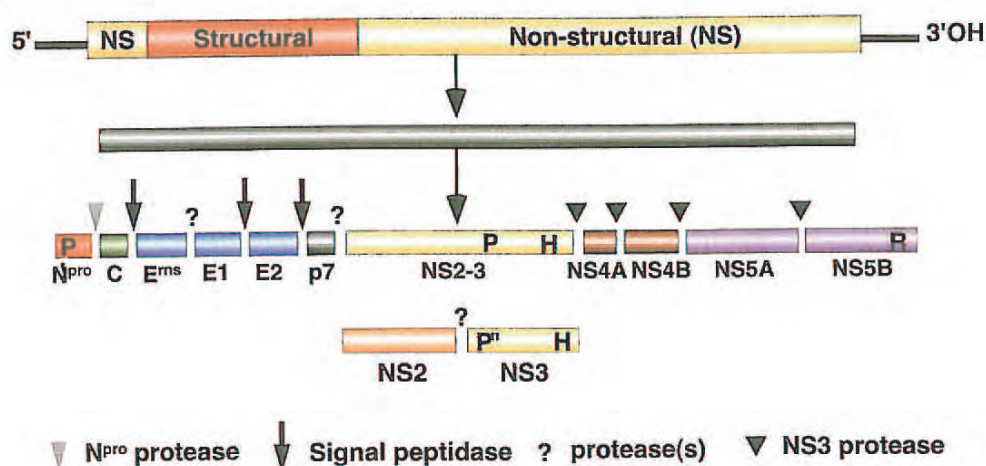


Fig. 1.3.2.2.1: Organizzazione del genoma dei *Pestivirus* e clivaggio della poliproteina (Fauquet *et al.*, 2005).

Il genoma di BVDV, codifica per una poliproteina di 3898 aa corrispondente ad una proteina di 438 kDa che successivamente viene clivata in 12 polipeptidi di cui 4 sono strutturali e 8 non strutturali.

- Proteine strutturali

I virioni sono composti di 4 proteine strutturali: la proteina del nucleocapside C (14kDa) e le 3 glicoproteine dell'envelope, E^{ms} (gp44/48), E1 (gp33), E2 (gp55).

C

La proteina C è la proteina capsidica. Questa proteina è costituita da 102 aa ed ha un peso molecolare di 14 kDa. E' una proteina ben conservata tra i diversi *Pestivirus* e la sua funzione sembra essere quella di "impacchettare" l'RNA genomico e di provvedere alle interazioni necessarie per la formazione dell'envelope. La proteina C mostra una bassa immunogenicità (Donis, 1995).

E0

La proteina E0 è una glicoproteina di 227 aa con un peso molecolare di 48 kDa. Questa proteina sembra essere una componente del virione benchè la mancanza di siti di ancoraggio suggeriscano una bassa interazione con l'envelope. E0 è una proteina molto conservata tra i diversi *Pestivirus*, ma la sua funzione non è stata del tutto chiarita anche se, alcuni studi, hanno attribuito a tale proteina una attività ribonucleasica (Schneider *et al.*, 1993). E0 induce un alto livello anticorpale nei bovini infetti anche se tali anticorpi hanno una bassa capacità neutralizzante.

E1

Il polipeptide E1 è formato da 195 aa ed il peso molecolare è di 25 kDa. Tale proteina contiene due domini idrofobici che servono per il suo ancoraggio alla membrana cellulare e per iniziare la traduzione del polipeptide adiacente, la proteina E2.

CAPITOLO 2. EPIDEMIOLOGIA

2.1 Diffusione geografica

La diarrea virale bovina è stata segnalata in numerosi paesi a partire dagli anni '40, tanto che la si può definire una malattia cosmopolita (Maglione *et al.*, 1990).

La prevalenza dell'infezione da BVDV è molto alta all'interno delle popolazioni bovine; la maggior parte degli studi mostrano, infatti, che la sieroprevalenza si attesta su valori simili nei diversi allevamenti o aree geografiche andando dal 60% all'85%. Sono state riscontrate sieroprevalenze dell'83% in Polonia (Polak e Zmudzinski, 1995), del 79,2% in Croazia (Biuk-Rudan *et al.*, 1998) e dell'80% in Belgio. In diversi stati del continente africano e americano sono state riscontrate siero-positività elevate, oscillanti dal 73% all'88% (Maglione *et al.*, 1990).

Anche le percentuali dei soggetti persistentemente infetti risulta abbastanza costante andando dallo 0,5% al 2% (Houe e Meyling, 1991; Polak e Zmudzinski, 1999; Biuk-Rudan *et al.*, 1998).

Tuttavia si possono riscontrare differenze significative soprattutto in relazione a determinati fattori epidemiologici tra i quali, la densità di popolazione, l'uso di vaccini, il commercio degli animali ed il tipo di stabulazione (Houe, 1999).

Infatti, sono state riscontrate sieroprevalenze elevate in aree ad alta densità di bovini e caratterizzate dalla presenza di grandi allevamenti (Houe e Meyling, 1991). Viceversa, sono state riscontrate percentuali molto basse di sieroprevalenza (0,8-1,6%) in quelle aree dove sono stati attuati piani di controllo e programmi di eradicazione oppure dove si pratica un'attenta sorveglianza sul commercio degli animali (sieroprevalenza del 21%) (Nuotio *et al.*, 1999; Mainar-Jaime *et al.*, 2001).

Il BVDV tipo 2, invece, è stato isolato solo alla fine degli anni '80 durante epidemie caratterizzate da forme emorragiche negli Stati Uniti e Canada (Corapi *et al.*, 1990). Indagini di laboratorio su sieri fetali bovini testati in diversi stati del nord America hanno evidenziato un'alta prevalenza di BVDV tipo 2 (Bolin e Ridpath, 1998).

Meno diffusi attualmente in Europa, i BVDV tipo 2 sembrano tuttavia aver fatto la loro apparizione. Infatti una sindrome emorragica è stata evidenziata nel 1992 in numerosi allevamenti del sud del Belgio (Broes *et al.*, 1992).

2.1.1 Situazione in Italia

La diarrea virale bovina è stata identificata per la prima volta in Italia nel 1960 da Poggi e Carboni che descrissero un'infezione presente da molti anni nella Pianura Padana corrispondente alla diarrea virale osservata nell'America del Nord (Poggi e Carboni, 1960).

Successive ricerche di Castrucci *et al.*, (1968) e di Avellini *et al.*, (1968) hanno dimostrato definitivamente la presenza del BVDV tramite isolamento su colture di cellule renali di bovino.

La diffusione dell'infezione da BVDV nel nostro Paese è ampia e, sulla base di riscontri sieroepidemiologici, risulta assumere una elevata prevalenza sia tra i bovini da latte che tra i bovini da carne (Cavirani *et al.*, 1992; Castrucci *et al.*, 1998).

Ricerche effettuate in diversi allevamenti di bovine da latte nel nord Italia hanno dimostrato che la prevalenza della positività sierologica si attesta dal 53 al 90% (Cavirani *et al.*, 1992; Luzzago *et al.*, 1999a).

Per quanto riguarda gli allevamenti da carne, uno studio svolto in bovini allevati in Nord Italia ha dimostrato un incremento sensibile delle sieropositività nei primi 5 mesi di allevamento passando dal 25% al 95%; ciò indica un'attiva circolazione di BVDV tra gli animali da carne e, quindi, un elevato e pressante rischio di contagio (Cavirani *et al.*, 1999).

In animali appartenenti ad allevamenti a indirizzo produttivo misto di alcune province piemontesi, sono state segnalate sieropositività che variano dal 53,5% al 67,2% (Maglione *et al.*, 1990).

Studi sulla prevalenza di soggetti immunotolleranti e persistentemente infetti, effettuati nei centri di fecondazione artificiale e in allevamenti di bovini da carne, hanno dimostrato come la prevalenza di tali soggetti è, in media, dell'1% (Cordioli *et al.*, 1996; Cavirani *et al.*, 2000) (Tab. 2.1.1.1).

Recentemente diversi studi hanno inoltre dimostrato la circolazione in Italia del BVDV tipo 2.

Luzzago *et al.*, (1999b) ha mostrato la circolazione del virus in un allevamento della provincia di Verona in cui si era verificato, nel periodo di marzo-aprile 1995, un focolaio con sintomatologia caratterizzata da trombocitopenia ed emorragie diffuse. Stipiti virali appartenenti al BVDV tipo 2 sono stati inoltre isolati da ovini nati disvitali

appartenenti ad allevamenti della Puglia e della Basilicata (Pratelli e Buonavoglia, 2000).

TIPO DI INDAGINE	PROVENIENZA CAMPIONI	ALLEVAMENTI SIEROPOSITIVI %	ANIMALI SIEROPOSITIVI %	PI %
Piano di controllo obbligatorio	Bolzano	96	59	1
Piano di controllo volontario	Lecco, Como	70	30	-
Piano di controllo volontario	Roma	57	31	0,3
Allevamenti con problemi riproduttivi	Nord Italia	100	53	-
Allevamenti con problemi riproduttivi	nazionale	89	62	-
Centro genetico	nazionale	-	-	1
Allevamenti da carne	Nord Italia	-	-	0,6
Allevamenti da carne	Nord Italia	-	32*	-

Tab. 2.1.1.1: risultati riguardanti la prevalenza del BVDV in Italia (Luzzago, 2005)

2.2 Recettività

I *Pestivirus* infettano naturalmente molte specie di ungulati ad unghia fessa che appartengono all'ordine *Artiodactyla*. Da recenti studi sembra che anche l'uomo sia sensibile all'infezione da *Pestivirus*.

2.2.1 Bovini

I bovini se non presentano copertura anticorpale sono recettivi durante tutta la vita. È soprattutto il BVDV tipo 1 a provocare le forme normalmente riscontrate mentre i casi dovuti al BVDV tipo 2 sono molto meno frequenti (Pellerin *et al.*, 1994).

Nella forma acuta causata da BVDV tipo 1 il tasso di morbidità varia dal 30% al 90% mentre la mortalità è molto ridotta, raggiungendo al massimo l'8% (Houe, 1995); la malattia può manifestarsi in tutte le classi di età, tuttavia essa è decisamente più frequente e più grave nei soggetti giovani. I casi di mortalità sono legati soprattutto a carenze di immunità passiva di origine colostrale o a complicazioni da parte di patogeni di irruzione secondaria (Baker, 1995). Un ruolo epidemiologico fondamentale è svolto dalle bovine gravide che non presentano protezione anticorpale; esse sono recettive per tutto il periodo della gravidanza e se infettate fino al quarto mese di gestazione, possono portare alla nascita di soggetti persistentemente infetti e immunotolleranti.

Le forme acute causate da BVDV tipo 2 sono caratterizzate da una mortalità che può raggiungere il 25% negli allevamenti dove il virus si presenta per la prima volta (Pellerin *et al.*, 1994).

Per quanto riguarda la Malattia delle Mucose la sua morbidità è bassa (5-10%) mentre la mortalità è elevata causando il decesso del 90-100% dei soggetti malati (Rossi, 1990).

2.2.2 Altri ruminanti domestici

Sono stati isolati molti ceppi di BVDV sia del tipo 1 che del tipo 2 nelle pecore e nelle capre (Vilcek *et al.*, 1997; Pratelli e Buonavoglia, 2000). Le infezioni sia naturali che sperimentali con BVDV causano in queste due specie patologie simili a quelle riscontrate nei bovini. Si possono manifestare, infatti, casi di aborto e, soprattutto, la nascita di agnelli e capretti disvitali (Pratelli e Buonavoglia, 2000).

Anche la specie bufalina è sensibile al virus della BVD; indagini sierologiche effettuate negli allevamenti di bufale da latte nel nord Italia hanno dimostrato che l'81,8% dei soggetti erano sieropositivi al BVDV (Cavirani *et al.*, 1995).

2.2.3 Altre specie domestiche

Indagini sierologiche hanno dimostrato una grande diffusione dell'infezione di *Pestivirus* anche nella popolazione suina; il tasso di sieroprevalenza può variare dal 3% al 40% e dipende soprattutto dal contatto con bovini e pecore ma anche dall'età dell'animale.

Nel corso di infezioni sperimentali con BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2 nella specie suina, non sono stati evidenziati sintomi clinici o lesioni anatomo-patologiche raffrontabili alla patologia dei bovini (Walz *et al.*, 1999).

2.2.4 Animali selvatici o in cattività

Le specie animali dalle quali è stato isolato il virus o che hanno presentato reazioni anticorpali per infezioni naturali attribuite a virus del genere Pestivirus sono diverse e distribuite in tutti i continenti. Indagini sierologiche hanno infatti dimostrato la presenza di anticorpi contro i *Pestivirus* in circa 50 specie di ruminanti selvatici o in cattività distribuiti all'interno delle famiglie *Camelidae*, *Giraffidae*, *Cervidae*, *Antilocapridae* e *Bovidae*.

Nella tabella 2.2.4.1 sono riportate le specie in cui sono stati riscontrati anticorpi contro i *Pestivirus* dovuti ad infezione naturale o in cui è stato isolato il virus (Nettleton, 1990).

FAMIGLIA	SPECIE	AUTORI
Camelidae	<i>Camelus dromedarius, Lama guanicoe, Lama pacos</i>	Doyle e Heuschele (1983) Foster <i>et al.</i> , (2005)
Cervidae	<i>Cervus axis, Cervus duvauceli, Muntiacus reevesi</i>	Doyle e Heuschele (1983)
	<i>Hidropotes inermis, Cervus nippon</i>	Lawman <i>et al.</i> , (1978)
	<i>Dama dama</i>	Edwards <i>et al.</i> , (1988)
	<i>Alces alces</i>	Vannier e Carnero (1985)
	<i>Odocoileus hemionus, Odocoileus virginianus</i>	Karstad (1981)
	<i>Cervus elaphus</i>	Blancou e Barrat (1984)
	<i>Capreolus capreolus</i>	Baradel <i>et al.</i> , (1988)
Giraffidae	<i>Giraffa camelopardalis</i>	Potts <i>et al.</i> , (1987)
Antilocapridae	<i>Antilocapra americana</i>	Barrett (1975)
Bovidae	<i>Taurotragus spp., Tragelaphus strepsiceros, Tragelaphus angasi, Oryx gazella, Hippotragus niger, Kobus defassa, Kobus ellipsiprymnus, Kobus leche, Redunca arundinum, Alcelaphus buselaphus, Damaliscus lunatus, Connochaetes spp., Aepyceros melampus, Antidorcas marsupialis, Sylvicapra grimmia, Syncerus caffer</i>	Hamblin e Hedger (1979)
	<i>Boselaphus tragocamelus, Damaliscus dorcas, Madoqua kirki, Capra aegagrus aegagrus, Capra hircus, Capricornis sumatraensis, Ovis vignei, Ammotragus lervia, Oreomys americanus, Bos gaurus, Bison bonasus</i>	Doyle e Heuschele (1983)
	<i>Gazella rufifrons</i>	Becher <i>et al.</i> , (1999) Roeder <i>et al.</i> , (1987)
	<i>Capra ibex, Rupicapra rupicapra, Rupicapra pirenaica pyrenaica</i>	Baradel <i>et al.</i> , (1988) Arnal <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Ovis canadensis</i>	Parks e England (1974)

Tab. 2.2.4.1: Animali selvatici e in cattività in cui è stata evidenziata infezione da *Pestivirus* (Nettleton, 1990 modificata)

2.2.5 Uomo

Alcuni studi hanno dimostrato la possibilità di riscontrare anticorpi anti-BVDV nel siero umano ed antigeni in campioni di feci. Giangaspero *et al.*, (1988) hanno riscontrato una prevalenza di anticorpi specifici anti-BVDV nell'87% in addestratori di animali e veterinari. In uno studio successivo lo stesso Autore ha rilevato su 1272 campioni di siero umano provenienti da Zambia ed Europa una prevalenza di anticorpi anti-BVDV del 15,3%. È stato evidenziato come la positività sierologica fosse più alta nei soggetti HIV positivi e, tra questi, soprattutto nei soggetti con la forma conclamata della malattia e con patologie connesse ad essa. Nel corso dello studio è stato inoltre isolato il BVDV dal buffy coat di 2 pazienti. Non è stato chiarito, tuttavia, se il virus isolato avesse un'origine umana o se rappresentasse un "adattamento" nell'uomo dei ceppi virali animali (Giangaspero *et al.*, 1993). Yolken *et al.*, (1989) testando 128 campioni di feci di bambini con diarrea non attribuibile ai comuni patogeni, hanno evidenziato che 30 (23,6%) erano positivi alla ricerca degli antigeni dei *Pestivirus*. La maggior parte dei campioni positivi provenivano da pazienti con età inferiore ad 1 anno con gastroenterite e con sintomi correlati ad infiammazione del tratto respiratorio.

2.3 Modalità di trasmissione

2.3.1 Trasmissione orizzontale

Questa via di trasmissione può avvenire per contatto diretto o indiretto. Sicuramente il contatto diretto tra animale malato ed animale sano rappresenta la via di trasmissione virale più importante.

I soggetti PI sono il principale serbatoio di infezione poiché eliminano continuamente grandi quantità di virus attraverso le escrezioni nasali, saliva, seme, urine, feci, scolo oculare e latte (Houe, 1995).

Anche gli animali con infezione acuta possono essere una fonte di infezione: l'eliminazione del virus, in questo caso, avviene a titoli più bassi rispetto all'eliminazione di un animale PI inoltre il periodo di escrezione del virus è relativamente basso protrandosi per 2-3 settimane.

La trasmissione interspecie del virus, pur essendo possibile e dimostrata, non rivestirebbe una grande importanza dal punto di vista epidemiologico poiché ormai vanno scomparendo gli allevamenti di tipo misto.

Per quanto riguarda la trasmissione aerea c'è qualche perplessità: infatti, il passaggio del virus da un animale all'altro tramite brevi distanze sembra essere possibile anche se non è stato dimostrato sperimentalmente (Houe, 1995).

In mandrie dove sono presenti animali PI a stretto contatto con animali sani o dove essi sono parzialmente separati è stata dimostrata una rapida diffusione del virus, mentre in quegli allevamenti dove gli animali PI sono separati dagli altri, il passaggio del virus risulta molto più lenta o addirittura assente (Houe, 1995).

La trasmissione del virus con il seme può essere una via importante d'infezione nella bovina. Per questo motivo sono stati introdotti anche in Italia dei provvedimenti di polizia sanitaria che prevedono controlli sui tori destinati ai centri di fecondazione artificiale, oltre che norme applicabili agli scambi intracomunitari di sperma congelato (Direttiva CEE 88/407, recepita dall'Italia con il DPR n.226 del 1/3/1992 Supplemento Ordinario G. U., 19 marzo, 66).

La trasmissione indiretta dell'infezione può avvenire anche attraverso l'embryo transfer. Il BVDV, infatti, può essere riscontrato negli animali donatori di gameti, nelle bovine riceventi e nei terreni utilizzati per la raccolta ed il trasferimento degli embrioni come, ad esempio, il siero fetale bovino (SFB). Per tale motivo si rende necessaria un'attenta scelta dei donatori dei gameti e delle riceventi l'embrione. Gli embrioni raccolti *in vivo* dovrebbero essere sottoposti a 10 lavaggi e dovrebbero essere trasferiti solo quegli embrioni in cui la zona pellucida è intatta. Per quanto riguarda gli embrioni ottenuti *in vitro* tutti i prodotti biologici utilizzati dovrebbero essere testati per rilevare la presenza del BVDV (Chastant e Maillard, 2000a).

Anche l'uso di vaccini può rappresentare un fattore di rischio per l'infezione da BVDV. È stato dimostrato, infatti, che bovine gravide sono state infettate per l'uso di vaccini vivi contaminati con BVDV biotipo non citopatogeno e che la malattia delle mucose può essere il risultato di ricombinazioni tra i ceppi vaccinali e i ceppi di campo (Ridpath e Bolin, 1995).

È stata inoltre dimostrata sperimentalmente la possibilità di isolare il BVDV da zanzare che si erano nutrite da animali PI; l'isolamento può essere effettuato fino a 96 ore dopo

il pasto di sangue (Houe, 1995). Tale via di infezione comunque non è importante ai fini pratici vista la bassa carica virale assunta dalla zanzara durante il pasto.

Altre vie di infezione indiretta possono essere rappresentate dall'utilizzo di strumenti chirurgici contaminati dal sangue o dal siero infetto (Fusco *et al.*, 1997), da strumenti per il contenimento degli animali come pinze per il naso (Gunn, 1993), guanti per l'eplorazione rettale (Lang-Ree, 1994), tramite l'utilizzo di strumenti infetti nella pratica dell'inseminazione artificiale (Chastant e Maillard, 2000a) e tramite stivali o scarpe contaminati.

2.3.2 Trasmissione verticale

Questa modalità di trasmissione si verifica quando viene infettata una vacca gravida; il virus, infatti, possiede la capacità di attraversare la barriera placentare. Entrambi i ceppi (cp ed ncp) sono in grado di oltrepassare tale barriera ma, mentre il ceppo citopatogeno causa sempre la morte del feto, il ceppo non citopatogeno può determinare la nascita di soggetti persistentemente infetti ed immunotolleranti (Pastoret *et al.*, 1998).

2.4 Epidemiologia molecolare del BVDV

Dall'analisi del genoma che si ottiene con l'utilizzo delle biotecnologie si possono trarre importanti informazioni di ordine epidemiologico oltre che di tipo patogenetico e antigenico (Lecomte *et al.*, 1998). Il monitoraggio genetico, infatti, permette di conoscere le varianti virali preesistenti circolanti e può rilevare l'introduzione di ceppi virali nuovi sia a livello dell'azienda sia a livello nazionale.

Molti paesi hanno intrapreso monitoraggi genetici al fine di determinare la presenza sul territorio di ceppi di BVDV (Sakoda *et al.*, 1999; Tajima *et al.*, 2001; Couvreur *et al.*, 2002; Hurtado *et al.*, 2003; Vilcek *et al.*, 2003a; Vilcek *et al.*, 2003b; Mishra *et al.*, 2004; Parks *et al.*, 2004; Toplak *et al.*, 2004; Mahony *et al.*, 2005; Stalder *et al.*, 2005; Tajima e Dubovi 2005).

Il genotipo BVDV racchiude infatti un gruppo di virus che si differenziano per struttura antigenica, effetto citopatogeno e virulenza (Ridpath, 2003).

Nei primi anni '90 in Nord America si riscontrarono delle infezioni da BVDV più gravi di quelle conosciute, associate a una sindrome emorragica e che presero il nome di SA BVDV (*Severe Acute BVDV*). I ceppi isolati da questi virus altamente patogeni furono messi a confronto, sia dal punto di vista antigenico che genomico, con i ceppi classici di BVDV. La virus neutralizzazione e il sequenziamento della regione altamente conservata 5'UTR portarono allo stesso risultato: i ceppi responsabili del quadro clinico più grave appartenevano a un gruppo distinto di BVDV. Comparando le sequenze di genoma dei diversi tipi di BVDV, si individuarono, infatti, due genotipi: BVDV-1 e BVDV-2, responsabile della forma associata a emorragia (Pellerin *et al.*, 1994).

L'esistenza di più genotipi ha una ricaduta diretta sul campo, basti pensare alle differenze sul piano biologico-clinico che si riscontrano durante l'infezione da BVDV. Confrontando BVDV-1 e BVDV-2, si può notare che:

- Sia del BVDV-1 che del BVDV-2 esistono due biotipi, citopatogeno e non citopatogeno. I ceppi non citopatogeni di entrambi i genotipi possono instaurare infezioni persistenti.
- Nel caso di infezioni acute in animali adulti, nella maggior parte dei casi, entrambi i genotipi danno forme lievi o subcliniche.
- Alcuni ceppi non citopatogeni di BVDV-2 sono responsabili di una forma molto grave, denominata sindrome emorragica e, in seguito chiamata *Severe Acute BVD* e caratterizzata da piressia ($>40^{\circ}\text{C}$ per tre o più giorni), trombocitopenia e leucopenia più o meno evidenti.
- C'è una netta differenza antigenica tra BVDV-1 e BVDV-2, evidenziabile con sieri policlonali e anticorpi monoclonali (Ridpath, 2003).

I due genotipi sono a loro volta suddivisibili in sottogenotipi (gruppi genetici distinguibili all'interno del genotipo). Per quanto riguarda BVDV-1, all'inizio erano stati descritti solo due gruppi, BVDV-1a (ceppo di riferimento NADL) e BVDV-1b (ceppo di riferimento OSLOSS) (Pellerin *et al.*, 1994). Becher *et al.*, (1999) studiando la regione del genoma N^{pro} e E2 suddivisero il BVDV in cinque sottogruppi distinti: 1a, 1b, 1c, 1d, 1e mentre il BVDV tipo 2, BDV ed il PSCV in due sottogruppi ciascuno.

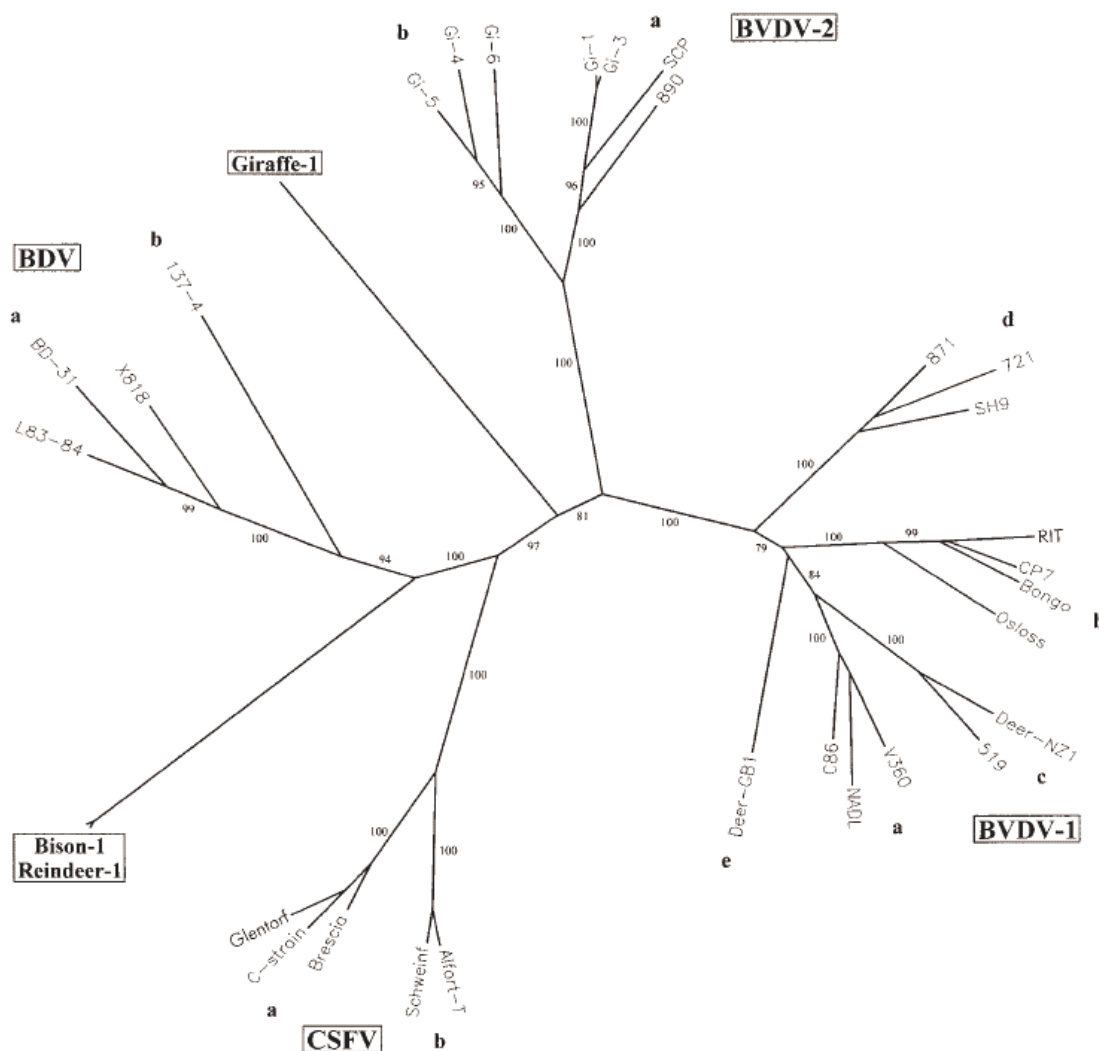
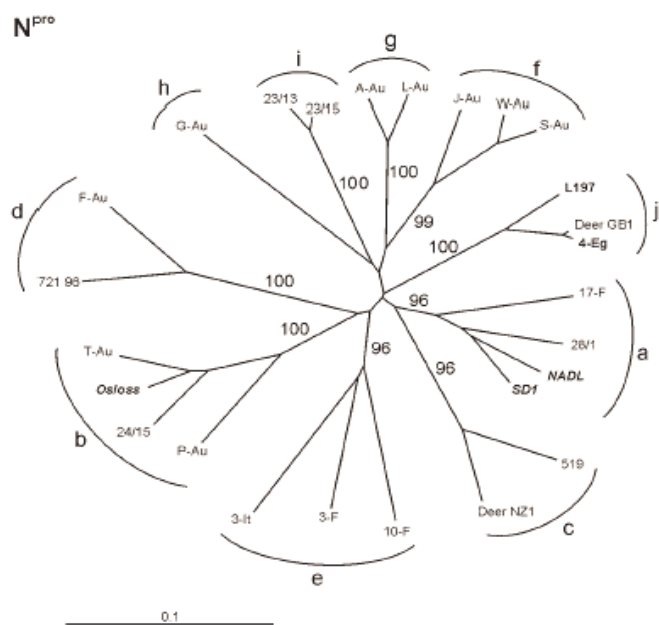


Fig 2.4.1: Dendrogramma che mostra la suddivisione dei *Pestivirus* in base alla regione N^{pro} (Becher *et al.*, 1999).

Successivamente, il BVDV-1 è stato suddiviso in ulteriori gruppi e in uno studio del 2001, Vilček, combinando l'analisi delle regioni 5'UTR e N^{pro} di 76 ceppi di BVDV-1 provenienti da tutto il mondo, ha ottenuto 11 gruppi filogenetici (1a-1j) (Vilcek *et al.*, 2001). Uno studio del 2004 (Vilček *et al.*, 2004), ha poi evidenziato la presenza di un dodicesimo sottotipo, BVDV-1k.



40

Gli alberi filogenetici prodotti suggeriscono che gli isolati del BVDV-1 si sono evoluti tutti da un antenato comune in direzioni genetiche diverse e con velocità evolutiva simile tra loro (Vilcek *et al.*, 2001) e con mutazioni a livello nucleotidico di poco rilievo, visto che le funzioni biologiche ed enzimatiche necessarie per la sopravvivenza del virus devono essere mantenute. A livello della sequenza 5'UTR, ad esempio, le mutazioni si concentrano in due regioni e sono tollerate solo quelle modificazioni che non alterano il significato biologico della struttura secondaria di questa regione. Lo stesso vale per la sequenza che codifica per la proteina N^{pro}.

Per quanto riguarda l'analisi filogenetica del genotipo BVDV-2, invece, sono stati riscontrati due sottotipi, il BVDV-2a e il BVDV-2b (Vilček, 2004; Ridpath, 2003; Bolin, 2004). Per altri Autori, però, si possono classificare 4 sottogenotipi. Giangaspero e Harasawa (2004), studiando la sostituzione nucleotidica palindromica (PNS) a livello di loci variabili V1, V2, V3 della regione 5'UTR, hanno evidenziato i sottotipi BVDV-2a e BVDV-2c che comprendono ceppi provenienti solo da bovini; BVDV-2b con ceppi isolati da bovini e pecore; BVDV-2d con ceppi di sole pecore. In particolare, il genotipo BVDV-2a e BVDV-2b includono isolati a bassa e alta virulenza, mentre il BVDV-2c e BVDV-2d solo quelli ad alta virulenza. La tipizzazione genetica del BVDV-2, non è ampia, probabilmente a causa dei pochi isolati, appartenenti a questo tipo, disponibili per le analisi.

L'analisi filogenetica dei ceppi circolanti dimostra come sia fondamentale lo studio del genotipo virale allo scopo di ottenere informazioni epidemiologiche importanti nello sviluppo di test diagnostici e per l'attuazione di migliori strategie di controllo della malattia riguardanti sia l'allestimento di vaccini che l'introduzione di norme per lo spostamento degli animali (Hurtado *et al.*, 2003).

CAPITOLO 3. PATOGENESI

3.1 Patogenesi della forma acuta

L'infezione sostenuta dal BVDV può avere una diversa evoluzione in relazione alle diverse modalità di trasmissione e dei biotipi coinvolti. Nella trasmissione orizzontale il virus penetra attraverso la mucosa orale, nasale, congiuntivale o genitale (Fusco *et al.*, 1997).

Alla penetrazione del virus segue una fase di eclisse della durata di circa sei ore in cui il virus non è reperibile in nessuna sede dell'organismo (Castrucci, 1992). Il virus si moltiplica inizialmente nelle sedi di penetrazione ed in seguito diffonde per via ematogena e linfatica, associato ai linfociti B e T. Questa fase di viremia si verifica dalle 48 alle 72 ore dopo l'infezione e nell'infezione acuta persiste per un periodo di 15 giorni (Brownlie *et al.*, 1987). Il virus replica nelle pareti dei vasi linfatici e negli elementi bianchi del sangue, soprattutto nei linfociti (secondo ciclo replicativo) quindi si trasferisce fino alla mucosa intestinale e alle strutture linfoidi (milza, linfonodi e timo). L'invasione del tessuto linfoide potrebbe spiegare la transitoria diminuzione delle difese immunitarie causata dalla diminuzione dei linfociti B e T.

La risposta immunitaria si manifesta dalla seconda settimana per raggiungere il picco massimo alla quarta-sesta settimana dopo l'infezione (Fusco *et al.*, 1997).

3.1.1 Riduzione delle difese immunitarie

I meccanismi dell'immunosoppressione coinvolgono vari aspetti del sistema immunitario. I linfociti ed i macrofagi rappresentano le cellule bersaglio del BVDV e durante l'infezione acuta si verifica una leucopenia transitoria con decremento dei linfociti T CD4+ e CD8+, dei linfociti B e dei neutrofili (Grooms, 1998a).

Tuttavia, uno studio svolto da Collen e Morrison, (2000) riguardante l'attività linfocitaria durante un'infezione acuta da BVDV, ha dimostrato che dopo la fase viremica si verifica una proliferazione dei linfociti T e, più specificamente, delle cellule CD4+ e CD8+ provocata dalle proteine dell'envelope, dalla proteina del capsido C, dalla proteina N^{pro} e dalla proteina non strutturale NS2-3.

Studi in vitro hanno dimostrato che le cause dell'immunosoppressione risiedono nella diminuzione della risposta dei linfociti alla stimolazione mitogena, nel decremento della produzione di interferone, nella minor produzione di interleuchina-1 e 2 (IL-1, IL-2) e di tumor necrosis factor (TNF) da parte dei monociti e nella diminuzione della loro risposta chemiotattica. Ulteriori studi hanno dimostrato che la diminuzione di linfociti T CD4+ determina un prolungamento della viremia. Inoltre, sebbene i linfociti CD4+ siano comunemente associati a funzioni di *helper*, essi possono anche essere citotossici e indurre apoptosi. Un riscontro pratico di ciò si ha nel fatto che nelle prime fasi di infezione acuta di BVDV, nei follicoli linfoidi si osserva morte cellulare per apoptosi (Liebler-Tenorio *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda i neutrofili di animali infetti con BVDV hanno una attività battericida ridotta, inoltre, la citotossicità cellulo-mediata ed anticorpo-dipendente viene significativamente alterata (Grooms, 1998a). È stato inoltre dimostrato che il BVDV è in grado di indurre la sintesi di elevati livelli di prostaglandine (PGE2) nelle cellule polmonari di feto bovino, le quali sopprimono la proliferazione delle cellule T (Whelsh *et al.*, 1995).

3.1.2 Patogenesi della forma gastro-enterica

Questa forma morbosa è la più frequente e compare nei soggetti recettivi, cioè non immuni, di età compresa tra i 6 e 24 mesi d'età. La presenza di anticorpi colostrali riduce la possibilità da parte del virus di causare la patologia nel vitello prima dello svezzamento (Nettleton e Entrican, 1995). Il virus si localizza prevalentemente a livello dell'epitelio della mucosa intestinale e delle placche del Peyer causando lesioni in tutto il tratto digerente (Trautwein, 1991): questa forma è frequentemente a carattere benigno, anche se, le lesioni da essa provocate rappresentano una via d'accesso per patogeni opportunisti che possono complicare il quadro sintomatologico. Il virus può essere isolato dalle secrezioni nasali e dal sangue dal 3° al 10° giorno della malattia (Trautwein, 1991).

3.1.3 Infezione acuta e patologia respiratoria

Il BVDV è implicato nella patogenesi di patologie respiratorie solitamente in associazione ad altri fattori che causano una ridotta attività della clearance polmonare. Fattori predisponenti possono essere lo stress da trasporto, il sovraffollamento in azienda, lo svezzamento ma anche agenti infettivi quali la *Pasteurella haemolytica*, il virus della parainfluenza-3 (PI-3), il virus sinciziale bovino (BRS), il bovine herpesvirus-1 (BHV-1) e il coronavirus (Grooms, 1998a).

E' stato dimostrato che il BVDV replica nei macrofagi alveolari causando una riduzione della capacità di queste cellule di fagocitare i batteri e di esprimere i recettori per il complemento (C3R) e per gli anticorpi (FcR). Inoltre è stato dimostrato da Olchoway *et al.*, (1997) che i macrofagi infettati con BVDV presentano un'aumentata capacità di produrre fattori precoagulanti che inducono le reazioni a cascata della coagulazione; questo porterebbe alla deposizione di fibrina a livello alveolare con la formazione di un ambiente favorevole alla replicazione batterica (Grooms, 1998a).

Sebbene Potgieter *et al.* (1984) abbiano dimostrato che l'inoculazione di BVDV in vitelli di 4-6 mesi provoca una sintomatologia respiratoria e una polmonite interstiziale, molti studi concordano sul fatto che sia la sinergia tra BVDV e altri patogeni a causare i quadri clinici respiratori.

L'inoculazione di BVDV in vitelli prima di essere infettati con il virus dell'IBR determina una maggiore diffusione nell'organismo dell'Herpesvirus tipo 1 (BHV-1) rispetto a soggetti infettati solo con il virus dell'IBR (Potgieter *et al.*, 1984). In modelli sperimentali è stata dimostrata anche l'effetto sinergico di BVDV e *Mannheimia hemolytica* (Potgieter *et al.*, 1995). Inoltre, BVDV potenzia l'effetto del virus respiratorio sinciziale (BRSV) e di *Mycoplasma pneumonia* (Liu *et al.*, 1999).

BVDV, pertanto, in forme respiratorie ad eziologia multipla svolge una funzione immunodepressiva, facilitando l'infezione da parte di altri agenti eziologici e aggravando il quadro clinico (Bolin e Grooms, 2004). Il virus, infatti, replica nei macrofagi alveolari riducendo significativamente la loro capacità di fagocitosi e l'espressione per i recettori del complemento (C3R) e dei recettori per gli anticorpi (FcR). Inoltre, nei macrofagi infettati, aumenta la produzione di un fattore procoagulante, fattore implicato nella reazione a cascata di deposito della fibrina,

aumentando, perciò, il deposito di fibrina negli alveoli, evento che facilita la moltiplicazione batterica secondaria (Grooms *et al.*, 1998a; Olchoway *et al.*, 1997).

In infezioni sperimentali di bovini con BVDV-2, si è dimostrato che questo genotipo provoca una grave broncopolmonite acuta fibrinosa (Odeon *et al.*, 1999). Altri studi sperimentali hanno suggerito come alcuni ceppi di BVDV abbiano un tropismo polmonare più spiccato e siano associati a quadri clinici respiratori più di altri (Baule *et al.*, 2001; Hamers *et al.*, 2000).

3.1.4 Infezione acuta e turbe della riproduzione

3.1.4.1 Maschio

Il virus diffonde dal siero al testicolo che rappresenta un sito di replicazione virale. Il BVDV infetta la componente acellulare, le cellule epiteliali spermatiche e le cellule del Sertoli ma non gli spermatozoi. La sua replicazione avviene, comunque, soprattutto a livello delle vescichette seminali dove, peraltro, non causa lesioni significative.

Il virus può essere isolato dallo sperma a partire dal 6°- 8° giorno dopo l'infezione fino al 14°-16° giorno. La sua eliminazione continua per diversi giorni dopo l'ultimo giorno di viremia e cessa con la produzione degli anticorpi neutralizzanti (Chastant e Maillard, 2000a). È stato anche riportato un caso di un toro che per un periodo di 9 mesi ha eliminato il BVDV con il seme senza mostrare viremia e con un titolo anticorpale elevato. L'esame post mortem ha dimostrato che il virus era stato esclusivamente sequestrato a livello testicolare e, poiché la barriera sangue-testicolo si sviluppa durante la pubertà, si è ipotizzata un'infezione durante questo periodo oppure un insulto meccanico alla barriera durante la fase viremica (Voges, 1998). I tori persistentemente infetti producono continuamente seme contaminato e di qualità significativamente ridotta (Moenning e Liess, 1995), esso presenta titoli elevati di virus, solitamente 100 volte più alti rispetto a quelli riscontrati nel sangue. In un toro PI la carica virale è di 10^8 TDCI₅₀/ml mentre per un toro con infezione acuta è di $10^{1.4}$ TDCI₅₀/ml (Chastant e Maillard, 2000a).

L'esame accurato del seme mostra che questo è di qualità significativamente scadente presentando una diminuzione della densità, della motilità e forme anomale degli

spermatozoi. La ripresa delle caratteristiche fisiologiche del seme dopo l'infezione acuta può essere notata solo dopo 76 giorni dall'infezione.

3.1.4.2 Bovina non gravida

L'infezione acuta da parte del BVDV nella bovina non gravida causa turbe della riproduzione dovute ad alterazioni della funzionalità ovarica (Chastant e Maillard, 2000b). Le turbe della sfera riproduttiva, in caso di infezione transitoria, possono essere conseguenti ad una contaminazione del tratto genitale ma compaiono più frequentemente in seguito ad una contaminazione per via nasale, con l'aerosol, o per via gastro-enterica.

Grooms *et al.*, (1998b) con un'infezione sperimentale di 20 bovine con BVDV-NCP hanno dimostrato che il virus provoca cambiamenti della funzione ovarica e che esso può ridurre sensibilmente la fertilità. Il virus è stato isolato dal corpo luteo durante il periodo viremico e dall'8° al 60° giorno post-infezione è stata evidenziata negli animali infettati una ooforite linfocitaria cronica causata dalla presenza di antigeni virali a livello delle cellule interstiziali e nelle cellule macrophage-like della corticale ovarica. Grooms *et al.*, (1998c) hanno inoltre comparato il diametro e la crescita dei follicoli in due cicli estrali prima e dopo un'infezione sperimentale con BVDV. Essi hanno dimostrato che la crescita dei follicoli era significativamente ridotta nelle bovine infette. Durante l'infezione vengono alterati anche i profili ematici ormonali: vi è infatti un aumento del livello di cortisolo che riduce la liberazione di LH oltre che una riduzione della concentrazione ematica dell'estradiolo (Chastant e Maillard, 2000b; Fray *et al.*, 1999).

Per quanto riguarda le bovine PI uno studio effettuato da Fray *et al.*, (1998) ha permesso di evidenziare alti livelli di BVDV a livello ovarico. Grazie a tecniche immunoistochimiche è stata riscontrata l'ampia diffusione degli antigeni virali NS3 ed E2 nello stroma ovarico, nelle cellule del cumulo ooforo e negli oociti dei follicoli primordiali, primari e secondari. Tali risultati hanno dimostrato che gli oociti bovini possono sostenere la replicazione virale del BVDV dal momento che la follicologenesi progredisce e che il BVDV può oltrepassare la barriera fisiologica rappresentata dalla zona pellucida permettendo così la trasmissione del virus attraverso la linea germinale.

3.1.4.3 Bovina gravida

L'infezione del BVDV in una bovina gravida causa l'infezione del feto per via transplacentare; le conseguenze sul feto dipendono principalmente dal suo stadio di sviluppo e dallo sviluppo del sistema immunitario al momento dell'infezione (Moenning e Liess, 1995).

Infezione da prima del concepimento allo stadio embrionale (dal 9° a 45° giorno di gestazione)

Da vari studi risulta che BVDV può avere un impatto significativo sulla performance riproduttive nelle prime fasi.

In un gruppo di bovine sieronegative esposte a soggetti persistentemente infetti, il tasso di concepimento è stato di 78.6%, 44.4% e 22.2% a seconda che ci fosse una sierocoversione prima, durante o dopo l'accoppiamento (Virakul *et al.*, 1988). In un altro studio, l'inoculazione per via nasale di BVDV 9 giorni prima dell'inseminazione ha determinato un tasso di concepimento del 44% rispetto al 79% del gruppo di controllo. Questa diminuzione del concepimento è da attribuire sia a turbe della fertilizzazione sia a morte embrionale precoce (McGowan *et al.*, 1993). Sempre nello stesso studio, il tasso di concepimento in bovine esposte ad animali PI 4 giorni dopo l'inseminazione è stato del 60%. Complessivamente, le bovine in cui era stata indotta l'infezione presentavano al 77° dall'inseminazione un tasso di gravidanza pari al 33%, rispetto al 79% del gruppo di controllo. Il meccanismo responsabile del diminuito tasso di concepimento non è stato ancora chiarito del tutto, ma, molto probabilmente, l'effetto dipende dal momento in cui avviene l'infezione. BVDV rimane localizzato per un lungo periodo di tempo nel tessuto ovarico in seguito a infezione sia con ceppi citopatogeni che non citopatogeni, tanto che ovaio e ovidotto rappresentano siti di intensa replicazione (Grooms *et al.*, 1998b). L'esposizione a BVDV degli oociti potrebbe determinare una ridotta capacità di sopravvivenza sia tramite un danno diretto alle cellule, sia, indirettamente, tramite cambiamenti nell'ambiente dell'oocita stesso. In seguito a infezione con BVDV citopatici, infatti, sono state descritte delle ooforiti

interstiziali che durano fino a 60 giorni (Grooms *et al.*, 1998b). Nel lungo periodo, le ooforiti potrebbero determinare difetti di funzionalità ovarica e una conseguente diminuzione del tasso di concepimento. In un gruppo di bovine infettate con BVDV e sottoposte a superovulazione il numero di corpi lutei palpabili era nettamente diminuito se comparato con un gruppo di controllo superovulato anch'esso (Kafi *et al.*, 1994). L'infezione con BVDV durante la fase preovulatoria determina una diminuzione del tasso di crescita follicolare e modula la secrezione dell'ormone ovarico determinando infertilità (Fray *et al.*, 1999). Nei soggetti PI, invece, le ovaie appaiono ipoplasiche e si ha una notevole riduzione del numero di follicoli antrali.

Visto il ruolo essenziale svolto nella fertilizzazione, cambiamenti nell'ambiente oviduttale possono essere deleteri per il tasso di concepimento. BVDV è stato isolato nelle cellule degli ovidotti e si è reso responsabile di salpingiti 21 giorni dopo infusione intrauterina del ceppo citopatico, mentre non sono stati segnalati effetti simili con BVDV non citopatico (Archbald *et al.*, 1977). I ceppi di BVDV citopatico hanno anche azione flogistica, dovuta alla presenza di infiltrazioni di linfociti e plasmacellule a livello endometriale e oviduttale. Oltre che per azione diretta, perciò, BVDV impedisce lo sviluppo embrionale anche tramite i suoi effetti flogistici, che impediscono la formazione di un ambiente adeguato (Grooms, 2004).

Studi *in vitro* hanno dimostrato la capacità di BVDV di influenzare la riproduttività dell'animale anche all'inizio della fase gestazionale. In cellule embrionali esposte *in vitro* a BVDV non citopatico per 7 giorni è stato possibile rilevare particelle virali a livello della zona pellucida, ma è stato dimostrato che l'integrità di questa zona è in grado di proteggere lo sviluppo dell'embrione dall'infezione di BVDV (Zurovac *et al.*, 1994). Sembra, infatti, che la zona pellucida protegga lo sviluppo embrionale dagli effetti diretti di BVDV. In seguito alla rimozione della zona pellucida allo stadio di blastocisti, sembra che solo ceppi citopatici di BVDV abbiano effetti negativi sulla sua vitalità; l'azione di ceppi non citopatici sullo sviluppo embrionale, pertanto, sarebbe più blando (Grooms, 2004).

Infezione dopo lo stadio embrionale (dal 45° al 175° giorno di gestazione)

Dopo l'impianto dello zigote, l'infezione transplacentare può avvenire sia con ceppi citopatogeno che non citopatogeno di BVDV.

Gli effetti dell'infezione dipendono dal momento dell'infezione, allo stato di immunocompetenza del feto, dal biotipo virale e dalla virulenza del virus. Sebbene non sia ancora chiaro come avvenga l'infezione fetale, si suppone che BVDV attraversi la placenta determinando una vasculite sul lato materno procurandosi, così, l'accesso alla circolazione fetale (Fredriksen et al., 1999).

In questa fase della gravidanza, le conseguenze dell'infezione sono l'aborto, l'immunotolleranza o difetti congeniti del vitello appena nato.

✓ Aborto

Sia il ceppo citopatogeno che quello non citopatogeno sono in grado di determinare aborto in soggetti inizialmente sieronegativi e infettati sperimentalmente (Done et al., 1980). In uno studio in campo, l'introduzione di BVDV in un allevamento sensibile ha determinato, nei successivi 6 mesi, aborto nel 21% delle bovine gravide (Roeder et al., 1986).

L'aborto in seguito a infezione di BVDV in bovine sensibili può avvenire in qualsiasi fase della gravidanza, sebbene sia più comune durante i primi tre mesi. A seconda del tempo d'infezione, si possono avere riassorbimento fetale, mummificazione o espulsione del feto.

L'aborto di solito avviene dai 10 ai 27 giorni dopo l'esposizione al virus ed è seguito da espulsione del feto 50 giorni dopo (Murray, 1991). Dato che tra l'aborto e l'espulsione del feto intercorre tutto questo tempo, l'isolamento del virus dal feto spesso non ha successo (Baker, 1987). In condizioni sperimentali o quando il feto viene espulso subito dopo l'aborto, si possono osservare a carico del feto congiuntiviti, polmoniti e miocarditi aspecifiche; mentre a carico della placenta sono riscontrabili vasculiti, edema, congestioni ed emorragie con aree di necrosi (Murray, 1991). Spesso, inoltre,

l'aborto è determinato dalla co-presenza di BVDV e di altri agenti patogeni, come ad esempio *Neospora caninum*.

✓ Immunotolleranza

I feti che sopravvivono all'infezione di BVDV non citopatogeno tra il 18° e il 125° giorno possono sviluppare immunotolleranza verso il virus e, conseguentemente, diventano persistentemente infetti. Non è ancora completamente chiarito il meccanismo con cui si instaura l'immunotolleranza, ma sicuramente la presenza del virus in circolo nel periodo in cui si instaura l'immunotolleranza (90-120 giorni) ne è la causa. In questa fase, le proteine virali vengono riconosciute come antigeni self dall'embrione impedendo la formazione di linfociti B e T specifici per BVDV. Questo comporta l'assenza di anticorpi neutralizzanti e non verso il virus, quindi l'animale all'esame sierologico risulta negativo, anche se rimane in grado di sviluppare una risposta immunitaria verso ceppi eterologhi di BVDV (McClurkin et al., 1985).

Studi sperimentali hanno dimostrato che il periodo più a rischio per la nascita di soggetti persistentemente infetti è verso il 75° giorno di gestazione (Cortese et al., 1998). Sebbene il verificarsi dell'infezione persistente sia infrequente dopo il 100° giorno di gravidanza, sono stati riportati casi di immunotolleranza instauratasi anche dopo il 125° giorno di gestazione (Baker, 1995).

È da ricordare come solo ceppi non citopatogeni possano determinare la nascita di soggetti portatori immunotolleranti, risultato confermato anche da studi sperimentali (Brownlie et al., 1989; McClurkin et al., 1985).

✓ Difetti congeniti

Tra il 100° e il 150° giorno di gravidanza si completa l'organogenesi e il sistema immunitario diventa pienamente funzionale. Durante questa fase, l'infezione da parte di BVDV è denominata "infezione congenita" e determina lesioni che sottolineano la sua spiccata attitudine teratogena, alla cui base sembra esserci la combinazione di danno cellulare indotto dal virus e la risposta infiammatoria dell'organismo verso il virus.

Poiché l'organogenesi è ancora in corso, il virus può danneggiare lo sviluppo delle cellule, inibire la differenziazione o provocare direttamente la lisi delle cellule staminali (Nettleton e Entrican, 1995).

Le anomalie congenite che coinvolgono il sistema nervoso centrale sono quelle più comuni e comprendono idrocefalia, idroanencefalia, ipoplasia cerebellare e ipomielinizzazione, quindi BVDV sembra avere un elevato tropismo per i neuroni.

Quando l'ipoplasia cerebellare è associata a cataratta, si parla di Sindrome oculocerebellare (Marcato, 2002). Per lo sviluppo di questa forma morbosa, sono in discussione due possibili meccanismi patogenetici: processi regressivi su base infiammatoria (vasculite) che tramite edema ed ischemia distruggono gli strati corticali del cervelletto e i vari strati della retina; oppure una primitiva e diretta interferenza citolitica di BVDV con lo sviluppo dei blastemi cellulari (Marcato, 2002). L'ipoplasia cerebellare dipende da una degenerazione cistica dei folia, conseguente a reazioni acute transitorie di tipo infiammatorio (leptomeningite purulenta), di tipo necrotico (necrosi delle cellule dello strato germinativo esterno), emorragico ed edematoso (edema dei folia), che dipende dalla perdita dell'integrità vascolare causata direttamente dal virus. Le lesioni vascolari sono di due tipi: arterite non purulenta e arterite necrotizzante a focolai.

Studi su BVDV hanno, inoltre, messo in evidenza come l'infezione della tiroide provochi una diminuzione degli ormoni T3 e T4; ciò causerebbe un effetto antagonista su un enzima essenziale per la normale mielinizzazione con conseguente ipomielinizzazione e malformazioni del SNC (Moenning e Liess, 1995).

Altri effetti teratogeni dell'infezione di BVDV in questo stadio sono cataratta, microftalmia, neurite ottica, degenerazione e atrofia retinica, ipoplasia timica e alopecia parziale (Done *et al.*, 1980). L'atrofia della retina è la conseguenza di pregressi fenomeni infiammatori acuti: una retinite che causa distruzione dei diversi strati della retina, una perivasculite dei vasi retinici interni, una proliferazione reattiva dell'epitelio pigmentato e una corioidite. La distruzione della membrana limitante esterna permette l'estensione della flogosi della retina all'epitelio pigmentato e alla corioidea.

Il feto può presentare alopecia parziale, che dipende da un difetto di sviluppo dei follicoli piliferi, determinato da una dermatite fetale, che consiste in una diffusa infiltrazione di mononucleati con distruzione delle cellule germinative dell'epidermide (Marcato, 2002).

Infezione nell'ultima fase di gestazione (dal 175° al 285° giorno di gestazione)

Nell'ultima fase della gestazione, l'immunocompetenza e l'organogenesi sono di solito complete, cosicché che il feto è in grado di attivare una risposta immunitaria effettiva nei confronti di BVDV e lo eliminano. I vitelli alla nascita sono normali e all'esame sierologico si evidenziano anticorpi neutralizzanti precolostrali (Brown *et al.*, 1973).

Comunque, vitelli infetti congenitamente da BVDV presentano maggiori rischi a livello sanitario rispetto a vitelli nati senza anticorpi neutralizzanti; entro i primi 10 mesi di vita, infatti, manifestano di solito gravi patologie (Munoz-Zanzi *et al.*, 2003).

3.2 BVDV 2 e sindrome emorragica

Come i ceppi di BVDV tipo 1 anche i ceppi di BVDV tipo 2 sono eterogenei e caratterizzati da vari livelli di citopatogenicità: infatti benché tutte le epidemie della forma emorragica siano associate al tipo 2, non tutti i virus appartenenti a tale gruppo sembrano causare questa sindrome (Ridpath *et al.*, 2000).

Topliff e Kelling (1998) studiando la struttura primaria e secondaria a livello della regione 5'UTR hanno infatti differenziato BVDV tipo 2 ad alta e bassa virulenza. Sembra che questa differenza sia causata da due sostituzioni nucleotidiche a livello del dominio D della regione suddetta che corrisponde all'IRES.

La patogenesi della forma emorragica non è comunque ancora del tutto chiarita. I problemi della coagulazione sono da attribuire alla grave trombocitopenia constatata negli animali colpiti dal BVDV tipo 2. Secondo Broes *et al.*, (1992) la trombocitopenia non sembra essere causato da un difetto nella produzione delle piastrine nel midollo osseo, ma piuttosto da una distruzione, un consumo eccessivo o un sequestro periferico. Rebhun *et al.*, (1989) propendono per una distruzione periferica delle piastrine, conseguente a danni causati dal virus. Quest'ultimo, infatti, causerebbe un'alterazione della membrana cellulare, seguita dall'agglutinazione e dalla lisi delle cellule.

Per dimostrare questa ipotesi, uno studio canadese ha valutato gli effetti sul midollo di un'infezione sperimentale con ceppi ad alta e bassa virulenza di BVDV-2 non citopatogeni. Nelle vacche inoculate si è osservata una deplezione di neutrofili, linfociti e piastrine nel sangue circolante per entrambi i ceppi, ma nel caso di quello ad alta

virulenza si è rilevato un maggiore decremento; per quanto concerne il midollo osseo si è rilevata una diminuzione del numero di cellule mieloidi mature solo con i ceppi ipervirulenti e per un periodo di 4-6 giorni (Wood *et al.* 2004).

Un'altra ipotesi prevede un danno centrale al midollo, per cui la riduzione delle piastrine potrebbe essere dovuta a una ridotta velocità di eritropoiesi in seguito a danni diretti al midollo osseo.

Recentemente, è stato anche isolato un ceppo neurovirulento di BVDV-2. Il ceppo 12F1, infatti, è stato individuato in tessuto cerebrale di animali che presentavano aree di meningoencefalite multifocale con degenerazione neuronale, necrosi e gliosi. Tramite tecniche immunoistochimiche, si è evidenziato come questo virus presenti un maggiore tropismo per il citoplasma dei neuroni, le cellule gliali, l'epitelio ependimale, i macrofagi perivascolari, le cellule del fuso, le cellule muscolari lisce e i monociti intravascolari del cervello (Blas-Machado *et al.*, 2004).

3.3 Malattia delle Mucose

La malattia delle mucose (MD) è stata riconosciuta come sindrome clinica da Ramsey e Chivers nel 1953. La patogenesi di tale malattia è stata compresa grazie all'aiuto di importanti scoperte tra le quali la scoperta che il BVDV poteva essere suddiviso nei due biotipi, NCP e CP (Gillespie *et al.*, 1960), la scoperta che i virus isolati dalle due manifestazioni cliniche, BVD e MD, erano sierologicamente correlati (Gillespie *et al.*, 1961) e la scoperta che gli animali persistentemente infetti potevano sviluppare la malattia delle mucose. Di grande aiuto è stato inoltre lo sviluppo della malattia per via sperimentale da parte di Brownlie *et al.*, (1984).

La teoria patogenetica tuttora più accreditata sostiene che lo stipite CP si forma a partire da mutazioni genetiche dello stipite virale NCP già presente nell'animale PI determinando una sorta di reinfezione endogena (Brownlie *et al.*, 1987). Tali mutazioni determinano costantemente la capacità del virus di esprimere la proteina NS3 definita, infatti, marker di citopatogenicità. L'Origine di questa proteina può avvenire attraverso la comparsa di un sito di clivaggio all'interno della proteina NS2-3, la comparsa di una proteasi all'estremità azotata della regione NS3 oppure grazie allo sviluppo di una struttura che ne permetta il clivaggio (Kummerer, 1998).

I meccanismi che portano all'espressione della proteina NS3 sono rappresentati da:

- ◆ Inserzioni di tratti di RNA di origine cellulare. Meyers e Thiel (1996) hanno evidenziato nel genoma virale del ceppo Osloss, l'inserzione di un tratto di RNA cellulare che codifica per una proteina della cellula ospite definita ubiquitina. Gli enzimi cellulari riconoscono il sito di clivaggio rappresentato dalla sequenza carbossilica terminale dell'ubiquitina (glicina-76) e danno origine alla proteina NS3 il cui genoma segue quello dell'ubiquitina. Mendez *et al.*, (1998) hanno invece dimostrato che l'origine della proteina NS3 nel ceppo NADL è dovuta all'inserzione di una sequenza di 270 nucleotidi dell'RNAm cellulare, chiamata cIns, a livello della regione genomica NS2. Altri esempi di inserzioni RNA di origine cellulare sono state riscontrate nel ceppo CPRt e nel ceppo JaCP (Becher *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1998). Recentemente è stata dimostrata la presenza nel genoma del ceppo CP 821 di un RNAm cellulare che codifica per la proteina cellulare NEDD8 (Baroth *et al.*, 2000).
- ◆ Duplicazioni e riarrangiamento di un tratto del genoma virale. Alcuni ceppi CP presentano un'inserzione di un tratto di RNA di 27 nucleotidi data da una duplicazione delle basi che formano il segmento tra il nucleotide 4064 e 4090. La trascrizione di questo tratto porta al clivaggio della proteina NS2-3 (Tautz *et al.*, 1996). Altri duplicati possono essere rappresentati dall'intero gene NS3 oppure dalla sequenza codificante per la proteina N^{pro} in associazione con il riarrangiamento delle sequenze nucleotidiche (Tautz *et al.*, 1998). In tali casi la proteina N^{pro} svolge la sua attività proteolitica all'estremità carbossilica generando la proteina NS3 a partire dalla sequenza duplicata e non dalla proteina NS2-3.
- ◆ Inserzioni e duplicazioni. In molti ceppi con inserzione dell'ubiquitina sono state osservate estese duplicazioni del genoma. I meccanismi che determinano la formazione della proteina NS3 possono essere rappresentati da inserzioni di 366 bp corrispondente a un monomero di ubiquitina associato ad una parte di un altro monomero all'estremità 5' oppure a duplicazione di 2384 bp del genoma virale corrispondente alla proteina NS3 a partire dalla sua estremità 5'.
- ◆ Delezioni di tratti del genoma. Tautz *et al.*, (1994) hanno evidenziato in un soggetto PI un ceppo CP DI9 deleto con una delezione della lunghezza dell'RNA virale di circa 4.3 kb. La delezione generalmente comprende la porzione delle proteine strutturali e della proteina NS2. La proteina NS3 viene generata per mezzo dell'attività

autoproteolitica della proteina N^{pro} che viene a trovarsi subito prima della proteina NS3 nel genoma della particella difettiva. La mancanza delle proteine strutturali in questi virus deleti fa sì che, una volta trasmessi a un vitello persistentemente infetto possano indurre la malattia con il supporto di qualsiasi ceppo NCP.

♦ Mutazioni puntiformi. Kummerer *et al.*, (1998) hanno descritto nel ceppo Oregon la formazione della proteina NS3 a partire da mutazioni puntiformi, ovvero sostituzioni nucleotidiche a livello del gene NS2. Queste mutazioni si traducono in una differente sequenza aminoacidica della proteina NS2 che determinando un cambiamento conformazionale permette il clivaggio della proteina NS2-3.

I ceppi citopatogeni rappresentano un vicolo cieco nell'evoluzione di BVDV, perchè la Malattia delle mucose di cui sono i responsabili, determina morte nel 100% dei casi e, in animali normali, i ceppi citopatogeni non danno infezioni produttive (Jones e Weber, 2004).

CAPITOLO 4. QUASISPECIE VIRALE E VARIABILITA' GENETICA

4.1 La quasispecie virale

“Le quasispecie virali sono distribuzioni dinamiche di mutanti e genomi virali ricombinanti correlati, ma non identici (Fig. 4.1.1 e 4.1.2), soggetti a continui processi di variazione genetica, competizione e selezione, che agiscono come una unità di selezione” (Domingo, 1999).

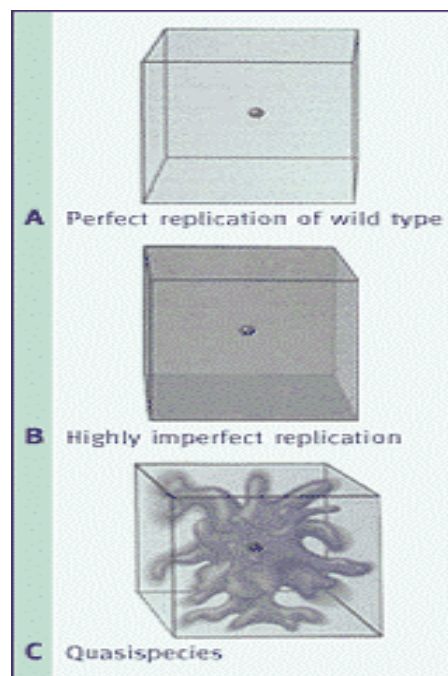
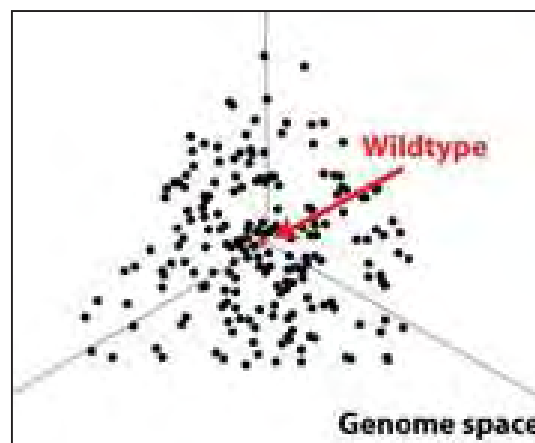


Fig. 4.1.1 e 4.1.2: rappresentazioni della quasispecie virale

La teoria della quasispecie ha la sua origine in un fondamentale articolo scritto da Eigen nel 1971 nel quale egli studiava la tendenza di macromolecole biologiche a produrre errori durante i processi di replicazione, soprattutto con lo scopo di capire le origini della vita. Tuttavia, Eigen non usò il termine quasispecie in questo articolo, egli coniò questo nuovo termine in un articolo successivo, scritto con Schuster (Eigen e Schuster, 1977).

Questi articoli di Eigen e collaboratori, sono i primi studi teorici sull'estrema variabilità nucleotidica causata da una replicazione intensamente soggetta ad errori.

Come conseguenza di questa teoria si sviluppò un grande interesse da parte dei ricercatori che lavoravano con i virus a RNA poiché questi virus replicano con un alto tasso di mutazioni e presentano popolazioni estremamente polimorfe (Wilke, 2005). La teoria della quasispecie descrive come una popolazione virale reagisce alle forze della selezione e della mutazione, e come queste due forze si controbilancino. Laddove le mutazioni aumentano la sopravvivenza di una particolare sequenza genomica, si ha una rapida espansione di cloni derivati da essa in grado di divenire, successivamente, la popolazione virale dominante (Domingo e Holland 1997).

Dal punto di vista dei virus, il mondo si trova in uno stato di cambiamento continuo. Per la loro sopravvivenza quindi, i virus devono potersi muovere da un organismo ad un altro ma, ciascun nuovo ospite differisce per qualche caratteristica da quello precedente. Inoltre, alcuni virus possono anche cambiare la specie ospite come, ad esempio, gli arbovirus che infettano alternativamente artropodi e vertebrati. In più all'interno dello stesso ospite non sempre le condizioni sono costanti, basti pensare al sistema immunitario degli organismi maggiori le cui abilità di attaccare mutanti virali, crescono enormemente dopo esposizione ai mutanti virali stessi.

Fortunatamente, dal punto di vista dei virus, la grande classe degli RNA virus è ben preparata a questi continui cambiamenti. Il loro alto tasso di replicazione insieme all'eccezionale tasso di mutazioni permettono un rapido adattamento in risposta ai cambiamenti ambientali (Wilke *et al.*, 2006).

I virus a RNA, rispetto ai DNA virus, vanno incontro a mutazioni molto più frequentemente. Le mutazioni puntiformi sono un evento abbastanza comuni nei virus a RNA e avvengono con una frequenza di circa 10^{-4} sostituzioni di base per sito ad ogni ciclo di replicazione (Drake and Holland, 1999).

Questi processi di mutazione genomica sono dovuti ad errori della RNA polimerasi durante il processo di sintesi dell'RNA.

In corso di replicazione, dal virus che ha infettato la cellula si formano molte copie di RNA a polarità negativa, che fungono da stampo per l'RNA che andrà a costituire la progenie virale. Perciò, una mutazione puntiforme durante la replicazione dell'RNA complementare produrrà una progenie diversa dal virus parentale, cioè un clone caratterizzato da quella modificazione genomica. Questo meccanismo può ripetersi a ogni ciclo di replicazione, generando, perciò, un'enorme quantità di nuovi virus. La moltitudine dei mutanti virali forma una quasispecie.

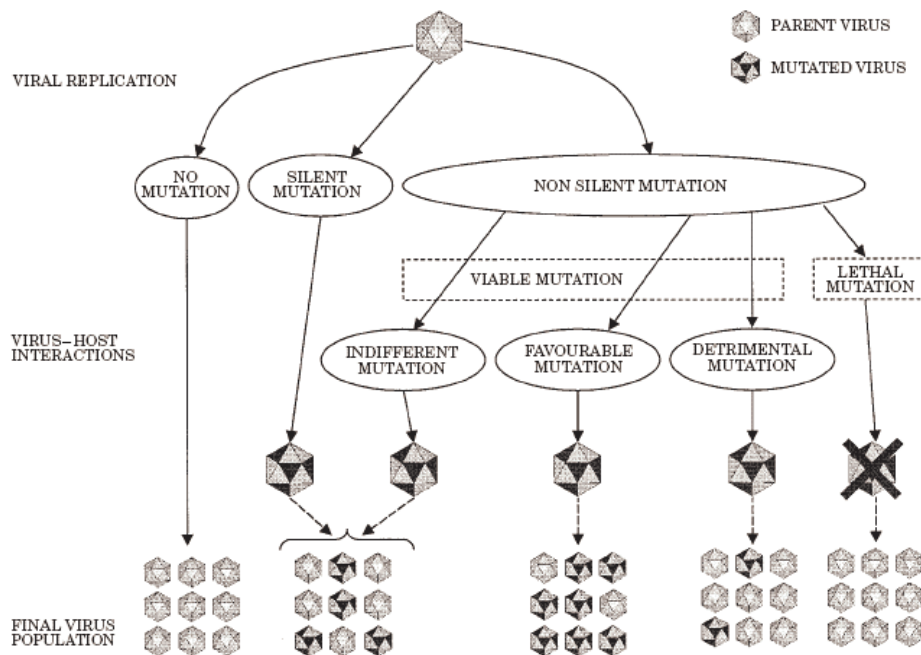


Fig. 4.1.3: Possibilità di formazione dei mutanti virali ad ogni ciclo di replicazione. Dopo molte repliche, la popolazione virale risultante è eterogenea e costituita da molte varianti (Hamers *et al.*, 2001)

Gli effetti delle mutazioni sono vari (Fig. 4.1.3):

- Nessuna conseguenza quando sono mutazioni silenti
- Mutazione letale se riguarda un gene essenziale.

- Virioni vitali, i cui effetti dipendono dalle interazioni virus-ospite;
- I virus mutati possono essere vitali, ma svantaggiati rispetto ai virus parentali, cosicché questi virus scompariranno presto;
- Alcune mutazioni possono portare a modificazioni antigeniche, che permettono al virus di eludere il sistema immunitario dell'ospite;
- Altre mutazioni possono favorire la moltiplicazione del virus o la capacità del virus di infettare altri tipi cellulari. In questi casi i ceppi mutanti prendono il posto del ceppo originario;
- Può capitare che le mutazioni non portino né vantaggi né svantaggi, cosicché si avrà la coesistenza di virus parentali e mutanti (Hamers *et al.*, 2001).

In condizioni normali, se le mutazioni non determinano un effettivo vantaggio per il virus, quella variante virale non avrà alcun futuro e la progenie virale tenderà a mantenere la sequenza parentale.

La capacità di generare a ogni ciclo replicativo dei mutanti virali permette, quindi, ai virus a RNA di adattarsi all'ospite, di eludere la sua risposta di difesa e, a volte, di creare delle infezioni persistenti (Chaston e Lidbury, 2001). Questi meccanismi, infatti, permettono al virus di resistere al sistema immunitario e prolungare il tempo di infezione, aumentando, pertanto, la possibilità di infettare nuovi ospiti. In ulteriori studi, si è discusso sull'ipotesi che i virus mutanti siano dotati di una memoria molecolare che permette loro di adattarsi durante i cicli successivi e essere, quindi, sempre in vantaggio nei confronti del sistema immunitario dell'ospite (Domingo, 2000).

Un problema allarmante riguardo alle mutazioni virali che avvengono normalmente in un organismo ospite, è rappresentato dai virus mutanti con resistenza ai farmaci. Attualmente si stima che fino al 25% delle nuove infezioni da HIV siano sostenute da ceppi resistenti ai farmaci antivirali (Wensing e Boucher, 2003).

La rilevazione delle mutazioni puntiformi si ottiene oltre che con il sequenziamento diretto, anche con altre tecniche tra le quali:

- SSCP (Single strand Conformation Polymorphism): in cui il materiale genetico è amplificato in PCR e dopo essere stato denaturato, viene fatto correre su un gel di poliacrilammide. Le molecole di DNA che migrano sul gel, assumono conformazioni secondarie differenti nel caso la loro sequenza sia diversa (anche per una sola base) e avranno quindi una mobilità elettroforetica diversa.

- RNase cleavage: consiste nella formazione di un eteroduplex RNA-DNA costituito dall'RNA wild type marcato radioattivamente e dal DNA mutante ottenuto tramite PCR, enella successiva digestione enzimatica delle regioni di misappaiamneto con RNase A.
- Non Isotopic RNase Cleavage Assay (NIRCA): varainte non radioattiva dell'RNase cleavage.
- Analisi degli eteroduplex (HA): consiste nella formazione di eteroduplex DNA wild type/DNA mutante o durante la PCR o lasciando ibridizzare i prodotti denaturati di 2 PCR diverse. Le molecole eteroduplex, anche con un solo misappaiamento possono mostrare diversa mobilità rispetto a omoduplex se vengono fatti correre in un gel di policrilammide.
- Chemical Mismatch cleavage-CMC: consiste nelle modificazioni e nel successivo taglio chimico delle basi misappaiate in un eteroduplex DNA-DNA o DNA-RNA. Gli eteroduplex tra un DNA wild type radioattivo e un DNA (RNA) mutante sono ottenuti tramite bollitura e riappaiamento. Negli eteroduplex le basi misappaiate a livello delle mutazioni sono modificate chimicamente usando idrossilammina e tetraossido di osmio. La modificazione chimica è quindi seguita dal taglio con piperidina e i prodotti sono separati su gel di acrilammidedenaturante.
- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): separa I frammenti in base alle loro differenti proprietà di dissociazione. Il DNA amplificato wild type e mutante è frazionato tramite un gradiente chimico denaturante. Quando i due filamenti si dissociano si ha una riduzione di velocità di migrazione rispetto alla molecola di DNAds. La presenza di mutazioni modifica le proprietà di melting del DNA amplificato rispetto a quello wild type. Questi due tipi di molecole quindi si dissoceranno in punti diversi del gradiente denaturante e saranno distinguibili dalla diversa migrazione elettroforetica, se caricati l'uno accanto all'altro su gel DGGE.
- Constant Denaturing Gel electroforesis (CDGE): questa tecnica permette di verificare la presenza di mutazioni in un grande numero di campioni dopo che la mutazione è stata identificata.
- Temporal Temperature gradient electrophoresis (TTGE): il DNA amplificato è caricato su gel di policrilammide contenente urea. Durante l'elettroforesi la temperatura è aumentata gradualmente: il risultato è un gradiente di temperatura lineare che si crea

man mano si svolge l'elettroforesi che permette di separare frammenti con diverso comportamento di melting. Sfrutta i principi della DGGE senza usare reagenti chimici.

- Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE): è una tecnica in cui viene formato un gradiente di temperatura per la separazione in una seconda dimensione e in cui la separazione avviene in base a differenze di conformazione.

- Protein Truncation Test (PTT): è un metodo di screening che permette di identificare mutazioni che provocano il blocco della traduzione, grazie alla rilevazione di proteine troncate su gel. (Guenzi S., 2000).

4.2 La quasispecie virale nel BVDV

I ceppi di BVDV sono caratterizzati da variabilità genetica, antigenica e patogenetica. L'origine di questa variabilità è da ricondurre alle mutazioni genetiche che avvengono frequentemente nei virus a RNA e al concetto di quasispecie che si è andato delineando con le sempre maggiori conoscenze del BVDV.

Nel BVDV, che ha 12300 basi, è garantita almeno una mutazione puntiforme per ogni ciclo di replicazione virale (Drake e Holland, 1999). Sicuramente, i mutanti virali caratterizzati da bassa virulenza sono quelli più capaci di adattarsi all'ospite e persistere in natura e, nel caso di BVDV, sono rappresentati da ceppi non citopatogeni a bassa virulenza.

Anche per il BVDV si può parlare di quasispecie, come si è dimostrato con l'analisi della regione 5'UTR. Questa regione è relativamente conservata, ma alterazioni della sua sequenza di basi sono state identificate dopo passaggi del virus in colture cellulari o da tessuti di animali infetti (Jones *et al.*, 2002; Ciulli *et al.*, 2004). La capacità di mutare rapidamente sequenze del proprio genoma permette al virus di produrre una progenie che replica meglio nell'ospite. In studi sperimentali si è modificata la regione 5'UTR in modo da sfavorire la replicazione, ma dopo pochi cicli di replicazione in colture cellulari, le mutazioni sono state riparate, perché si sono naturalmente selezionati mutanti più adatti a replicare rispetto al virus parentale (Becher *et al.*, 2000).

Le varianti genetiche di BVDV presentano mutazioni soprattutto a livello della regione E2; alcune variazioni sono responsabili di una diversa sequenza aminoacidica nella glicoproteina E2, importante a livello immunitario in quanto target di anticorpi

neutralizzanti. Queste mutazioni, quindi, permettono al virus, durante la fase acuta dell'infezione, di sfuggire al sistema immunitario.

In soggetti persistentemente infetti la presenza di modificazioni antigeniche sembrano essere letali per il virus.

L'immunosintolleranza che si instaura in questi animali, infatti, è specifica per un determinato ceppo di BVDV, sembra favorire il mantenimento piuttosto che l'evoluzione antigenica della popolazione virale esistente (Paton *et al.*, 1994, Collins *et al.*, 1999) e, variazioni nel pattern antigenico determinano una risposta immunitaria contro la nuova popolazione virale. Per questo motivo le varianti virali che si riscontrano in animali persistentemente infetti tendono a mantenere una sequenza genomica stabile. Tuttavia l'analisi delle sequenze di cloni e della "master sequence" della regione E2, di due soggetti PI a diversi tempi di infezione, ha dimostrato una variazione della sequenza e mutazioni a carico dell'RNA e della sequenza amminoacidica dimostrando un processo dinamico di evoluzione virale. La presenza di quasispecie virale in soggetti PI stimolerebbe la risposta immunitaria in tali soggetti immunosintolleranti (Collins *et al.*, 1999)

Oltre a mutazioni puntiformi, i virus a RNA sono anche soggetti a fenomeni di ricombinazione. Questo processo può essere omologo (quando si ha la ricombinazione dello stesso RNA virale, self-RNA) o non omologo (quando si hanno ricombinazioni di RNA da altri BVDV o da cellule ospiti infette). Nel caso di BVDV, le ricombinazioni sono responsabili di cambiamenti nel biotipo virale.

Le ricombinazioni possono avvenire tra diversi ceppi di BVDV, BVDV e altri *Pestivirus*, BVDV e RNA dell'ospite cellulare.

Fenomeni ricombinanti possono avvenire in qualsiasi sito del genoma, ma i più interessanti sono quelli a livelli del gene per la proteina NS3, dato che l'espressione della proteina NS3 porta alla formazione di ceppi citopatogeni, responsabili della Malattia delle Mucose.

Recentemente sono state dimostrate anche ricombinazioni omologhe intra-genotipo in ceppi non citopatogeni sia di BVDV-1 che BVDV-2, e, nel caso di un ceppo non citopatogeno di BVDV-1, inter-genotipo (Jones e Weber, 2004). I risultati di questo studio hanno portato a ipotizzare che la ricombinazione funga da processo alternativo alle mutazioni puntiformi quando c'è una forte pressione selettiva su una regione

determinata del genoma, permettendo così la continua evoluzione di BVDV-1 e BVDV-2.

Nessuno studio ha osservato la ricombinazione *in vitro* di BVDV; *in vivo* l'evento è prevalentemente associato allo sviluppo della Malattia delle Mucose ed è legato a una forte pressione selettiva.

Come già ricordato, la variabilità è anche responsabile della capacità di BVDV di eludere il sistema immunitario e, quindi, di causare infezioni persistenti nei bovini.

Proprio per questa capacità di variazione, è necessario eliminare gli animali persistentemente infetti; infatti, ridurre la carica di BVDV nella popolazione bovina porta alla riduzione del grado di variabilità incontrato.

Conoscere la variabilità di BVDV, perciò, è fondamentale per capire i diversi meccanismi patogenetici del virus, per monitorare l'epidemiologia dei diversi ceppi e per mettere a punto test diagnostici e vaccini *ad hoc*.

CAPITOLO 5. SINTOMATOLOGIA

La risposta clinica all'infezione da BVDV dipende da molteplici fattori legati alle caratteristiche dell'ospite e del virus quali l'immunocompetenza o l'immunotolleranza dell'ospite al virus, lo stato di gravidanza e l'età del feto, la presenza di anticorpi passivi, gli stress ambientali, il gruppo di appartenenza del virus (tipo 1 o tipo 2), la virulenza del ceppo e la dose infettante (Baker, 1995).

5.1 Forma subclinica

E' stato osservato che in bovini immunocompetenti il BVDV tipo 1 causa un'infezione che spesso decorre in maniera asintomatica, alle volte, invece, appare una sintomatologia blanda caratterizzata da un leggero rialzo febbrile, leucopenia, inappetenza e diarrea. Si può inoltre riscontrare un calo nella produzione lattea (Baker, 1995).

5.2 Forma acuta

In una mandria recettiva all'infezione, si può riscontrare una forma caratterizzata da diarrea che colpisce soprattutto gli animali dai sei mesi ad un anno di età. L'incubazione è seguita da una febbre transitoria e leucopenia ed oltre alla diarrea i sintomi clinici riscontrabili includono depressione, anoressia, scolo oculo-nasale, calo della produzione di latte e, occasionalmente, lesioni del cavo orale caratterizzate da erosioni ed ulcere.

L'abbassamento delle difese immunitarie dovuto all'infezione da parte del BVDV può predisporre ad infezioni secondarie da *Pasteurella haemolytica*, bovine herpesvirus tipo 1, virus respiratorio sinciziale bovino che causano patologie respiratorie che colpiscono soprattutto gli animali giovani (Baker, 1995).

Nelle bovine non gravide l'infezione da BVDV causa turbe della riproduzione come infertilità, infecondità e "repeat breeding" (Chastant e Maillard, 2000b). Nel maschio si assiste ad un calo della fertilità del seme che presenta densità e motilità ridotte e forme anomale negli spermatozoi (Moenning e Liess, 1995).

5.3 Forma acuta nella bovina gravida

L'infezione da BVDV in bovine gravide può decorrere con una sintomatologia subclinica. Una conseguenza importante dell'infezione da BVDV è però la possibilità di infezione del feto attraverso la placenta. È importante ricordare, infatti, che la mancanza di sintomatologia evidente nella bovina non significa che vi è una protezione del feto o che si possa escludere la possibilità di infezione transplacentare (Baker, 1995).

L'infezione da parte del BVDV nel primo trimestre di gravidanza causa, nella maggior parte dei casi, la morte del feto ed aborto.

I soggetti PI, nati dall'infezione da BVDV prima dello sviluppo dell'immunità fetale, sono normalmente indistinguibili dai vitelli sani ma, in alcuni casi, possono mostrare un ritardo nella crescita, una taglia ridotta ed una costituzione debole. I soggetti PI mostrano un tasso di mortalità alto nel primo anno di vita e sono più sensibili allo sviluppo di altre patologie soprattutto a localizzazione polmonare ed enterica; questa maggiore sensibilità alle infezioni è causata dall'immunosoppressione indotta dall'infezione persistente con BVDV (Baker, 1995).

Il BVDV è un importante agente teratogeno nel bovino. L'infezione del feto tra il 120° e il 150° giorni della gestazione può causare numerosi difetti congeniti. Questo periodo dello sviluppo fetale corrisponde infatti all'ultimo stadio della organogenesi del sistema nervoso centrale e allo sviluppo del sistema immunitario che provoca una risposta infiammatoria verso il BVDV. I sintomi neurologici sono già presenti alla nascita e sono abbastanza variabili in dipendenza dalla forma e dalla gravità della malformazione dell'encefalo. Non sempre, però, si osserva una diretta correlazione tra la gravità dei sintomi clinici e le alterazioni morfologiche (Trautwein, 1991).

I vitelli con ipoplasia cerebellare assumono a fatica la stazione quadrupedale; si possono apprezzare tremori causati dalla ridotta mielinizzazione e incoordinazione. A intervalli si osservano movimenti della testa, alcuni soggetti mostrano torcicollo e opistotono (Trautwein, 1991).

Possono essere presenti nistagmo e difetti dell'occhio che provocano vari gradi di cecità e cataratta. L'esame oftalmico può inoltre rivelare cheratiti interstiziali.

In ogni stadio di gestazione, l'infezione col BVDV può essere causa di ritardo della crescita che si manifesta con nanismo e basso peso alla nascita. Inoltre sono state associate all'infezione fratture congenite ed una patologia definita "malattia della iena".

Tale malattia, segnalata per la prima volta in Francia nel 1975, fu associata solo successivamente all'infezione da BVDV. La malattia della iena è descritta come un'osteopatia morfodistrofica delle ossa lunghe, riconducibile ad un difettoso sviluppo scheletrico del giovane bovino che determina nell'animale colpito un tipico aspetto da iena (Espinasse *et al.*, 1986). Oltre ai problemi neurologici e scheletrici sono state evidenziate lesioni dell'apparato tegumentario: i soggetti possono mostrare aree di ipotricosi, alopecie diffuse, ed un tipico aspetto del pelo definito "curly hair coat" (Baker, 1995).

I vitelli infettati nell'ultimo periodo della gravidanza nascono sani e sieropositivi al BVDV.

5.4 Forma emorragica

La forma emorragica è stata evidenziata sia negli animali adulti sia nei vitelli. La sintomatologia nell'adulto è caratterizzata da febbre, linfopenia, neutropenia, diarrea sanguinolenta, epistassi, petecchie ed ecchimosi a livello delle mucose e sanguinamento nei punti in cui viene praticata un'iniezione. È riscontrabile anche ifema.

I problemi della coagulazione devono essere attribuiti alla marcata trombocitopenia; gli esami ematologici mostrano infatti una grave riduzione delle piastrine che possono variare da 2000 a 33000/ μ l (i valori normali si collocano tra 100.000 e 800.000 piastrine/ μ l). Sempre a causa di BVDV-2, alcuni vitelli possono mostrare lesioni preponderanti a carico dell'apparato gastro-enterico senza ulteriore sintomatologia specifica (Odeon *et al.*, 2003).

Recentemente è stato isolato un ceppo di BVDV-2 che determina esclusivamente una sintomatologia nervosa, caratterizzata da letargia, grave atassia, decubito, colpi apoplettici e protrusione bilaterale dei bulbi oculari (Blas-Machado *et al.*, 2003).

Tali studi confermano ulteriormente la difficoltà di raggiungere una diagnosi eziologia certa basandosi sul solo reperto clinico in mancanza di un'indagine di laboratorio che porti ad una adeguata caratterizzazione virale (Odeon *et al.*, 2003).

5.5 Malattia delle Mucose

La malattia delle mucose colpisce i vitelli persistentemente infetti fra i 6 mesi ed i 2 anni di età; si possono riscontrare due forme cliniche di questa malattia: una forma acuta con mortalità che raggiunge anche il 100% ed una forma cronica alla quale è associata un'alta mortalità ma caratterizzata da un lento decorso.

5.5.1 Forma acuta

L'incubazione della forma acuta di MD sperimentalmente accertata dura da 4 a 6 giorni ma nelle condizioni naturali può durare fino a tre settimane (Trautwein, 1991).

Tale forma è caratterizzata da piressia ($40,5^{\circ}\text{C}$ - 41°C), depressione, debolezza e anoressia, polso e respiro rapidi. Nel corso della malattia si sviluppano emaciazione, disidratazione ed acidosi. La produzione latte subisce un forte calo (Baker, 1995).

L'esame della cavità orale mostra lesioni sulla mucosa: iperemia focale diffusa, focolai necrotici biancastri, lesioni erosive a margini distinti di 1-2 mm di diametro e di forma rotondeggiante (Trautwein, 1991). Le lesioni coinvolgono anche le labbra, i margini gengivali, la lingua il cui epitelio degenerato forma placche piatte e biancastre, il palato duro e molle (Fig. 5.5.1.1, 5.5.1.2 e 5.5.1.3). Le lesioni possono confluire formando ampie aree necrotiche che si distaccano. Le lesioni erosive si possono apprezzare anche a livello di musello, narici e cavità nasale oltre che a livello vulvare e dei capezzoli.



Fig. 5.5.1.1 e 5.5.1.2: lesioni buccali e gengivali



Fig. 5.5.1.3: lesioni buccali con intenso ptialismo

Nell'80% dei casi si osserva ptialismo, spesso si osservano una abbondante lacrimazione, scolo oculare e nasale mucopurulento (Fig. 5.5.1.4 e 5.5.1.5) e edema corneale.



Fig. 5.5.1.4: scolo oculare e nasale mucopurulento



Fig. 5.5.1.5: scolo oculare e nasale mucopurulento

Una diarrea profusa ed acquosa si sviluppa due o tre giorni dopo i primi segni clinici; le feci sono di odore nauseabondo e contengono tracce di sangue fresco o coagulato, muco e fibrina (Fig. 5.5.1.6 e 5.5.1.7).



Fig. 5.5.1.6: feci sanguinolente



Fig. 5.5.1.7: feci diarroiche e sanguinolenti

La ruminazione diminuisce e si può osservare un modico meteorismo. Nei primi stadi della malattia si riscontra una marcata leucopenia e, solo successivamente, si manifestano neutropenia, linfopenia e trombocitopenia. Sono molto comuni infezioni batteriche secondarie.

In alcuni casi può manifestarsi una zoppia causata da lesioni al cercine coronario e lesioni infiammatorie erosive a livello degli spazi interungueali (Trautwein, 1991) (Fig. 5.5.1.8).



Fig. 5.5.1.8: lesione dello spazio interdigitale

Sono stati segnalati inoltre da Tajima *et al.*, (1992), Tanyima *et al.*, (1995), e Simon e Douart (1999) alcuni casi di diabete mellito in soggetti con malattia delle mucose.

L'incidenza elevata del diabete mellito negli animali affetti da malattia delle mucose suggerisce che il virus possa indurre tali patologie a causa delle anomalie immunologiche che esso provoca.

5.5.2 Forma cronica

La forma cronica della Malattia delle Mucose è caratterizzata da inappetenza, progressiva perdita di peso ed emaciazione. La diarrea può essere continua o intermittente e si riscontra comunemente meteorismo cronico. Frequenti sono inoltre lo scolo nasale ed oculare (Baker, 1995).

Nella regione del collo, spalle e a livello perineale si sviluppano aree eczematose che esitano in una dermatosi, ipercheratosi e paracheratosi accompagnate da ipotricosi e alopecia; sotto le scaglie cutanee secche il derma sembra iperemico ed ispessito. Quando le formazioni crostose sono ben delineate può essere evidenziata una zona iperemica al margine delle lesioni (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

Lesioni di tipo erosivo sono riscontrabili nella cavità orale e sulla cute soprattutto a livello della regione perineale, prepuziale, vulvare, a livello della base delle corna, sui garretti e nello spazio interdigitale.

Zoppie di lunga durata si possono sviluppare a causa di laminiti, necrosi interdigitali e di deformazioni dello zoccolo.

Il quadro ematologico mostra pancitopenia caratterizzata da anemia, leucopenia, neutropenia e linfopenia.

Anche in questa forma sono comuni le infezioni batteriche secondarie.

I bovini con malattia delle mucose cronica possono sopravvivere anche fino a 18 mesi e muoiono solitamente per la grave debilitazione (Baker, 1995).

CAPITOLO 6. LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE

6.1 Lesioni nella Diarrea Virale Bovina

6.1.1 Forma acuta

Le lesioni anatomico-patologiche dell'apparato digerente, provocate dalla forma acuta di BVD, sono normalmente poco pronunciate e aspecifiche. Entrambi i biotipi cp e ncp causano edema a livello intestinale, occasionalmente possono provocare emorragie ecchimotiche ed una lieve reazione infiammatoria nei linfonodi mesenterici. Sono state descritte anche lesioni esofagee caratterizzate da erosioni e ulcere. A volte le lesioni appaiono simili a quelle riscontrate nella malattia delle mucose e consistono in erosioni lineari ed emorragie dell'apparato digerente, atrofia ed emorragie delle placche del Peyer (Bielefeldt e Ohmann, 1995). Durante l'infezione acuta da BVDV in bovine gravide si possono verificare casi di aborto che si manifestano nei primi mesi di gestazione. I feti abortiti, frequentemente mummificati, e le placente non presentano lesioni specifiche (Douart e Simon, 1997).

Il BVDV pur rientrando nel complesso delle patologie respiratorie bovine non causa alterazioni patologiche del tessuto polmonare, ma per la sua attività immunosoppressiva può facilitare l'azione di germi di irruzione secondaria che sono i veri responsabili delle lesioni a carico dell'apparato respiratorio.

6.1.2 Forma emorragica

Questa sindrome può causare morte iperacuta senza determinare lesioni evidenti, mentre in altri casi il solo riscontro anatomico-patologico è rappresentato da emorragie delle placche del Peyer. Altri riscontri patologici consistono in petecchie ed ecchimosi distribuite in tutto il corpo: a livello della sclera dell'occhio, sul margine interno delle palpebre, sulla superficie mucosa delle guance e delle gengive, sulle superfici dorsale e ventrale della lingua e del palato molle, a livello di mucosa esofagea e dell'epitelio ruminale, sulla superficie mucosa dell'abomaso, dell'intestino e sull'epicardio (Bielefeldt-Ohmann, 1995). All'esame necroscopico di soggetti infettati sperimentalmente sono state inoltre evidenziate lesioni emorragiche a livello

diaframmatico, sulla superficie della cistifellea, delle surrenali e della vescica (Corapi *et al.*, 1990). L'analisi del midollo osseo può mostrare quadri di necrosi oppure di megacariocitosi (Rebhun *et al.*, 1989).

6.1.3 Lesioni da infezione congenita

Sia nei feti che nei vitelli prematuri o partoriti a termine si possono trovare lesioni attribuibili a BVDV: focolai emorragici ed erosivo-ulcerativi di alcuni mm di diametro nella mucosa della cavità orale, nell'esofago, nella laringe, nell'abomaso. Occasionalmente si osserva una dermatite fetale.

L'infezione del feto bovino prima dei 150 giorni di gestazione può portare ad una dermatite fetale con aree necrotiche multifocali ed a ipotricosi generalizzata.

Feto

Soprattutto nei vitelli nati a termine gravidanza, sono frequenti varie lesioni malformative congenite, dovute all'effetto teratogeno di BVDV.

Tipiche, sono l'ipoplasia cerebellare di vario grado e a cataratta (c.d. sindrome oculocerebellare). Le lesioni del cervelletto possono consistere in un'ipoplasia molto accentuata oppure in una ipoplasia modesta e appena percettibile.

Tra le lesioni oculari si riscontrano: emorragie orbitali, opacamente corneale, coaguli fibrinosi nelle camere oculari atrofia della retina, ipoplasia del nervo ottico, microftalmia.

Altre lesioni congenite rilevabili sono rappresentate da idrocefalo, microcefalia, ipomielinogenesi spinale, brachignatia, aplasia del timo, alopecia parziale.

Le lesioni anatomo-patologiche riconosciute come possibile conseguenza di un'infezione intrauterina da parte di BVDV sono riportate nella seguente tabella.

Difetti congeniti associati al BVDV	
Sistema nervoso	Lesioni oculari
Microencefalopatia	Atrofia e displasia della retina
Ipoplasia cerebellare	Neurite del nervo ottico
Idranencefalo	Cataratta
Idrocefalo	Microftalmia
Ipomielinogenesi	Cheratite interstiziale
Poroencefalo	Sistema respiratorio
Sistema muscoloscheletrico	Ipoplasia polmonare
Brachignatismo	Sistema immunitario
Artrogrifosi	Ipoplasia/atrofia timica
Osteogenesi imperfetta	

Tab. 6.1.3.1: Malformazioni congenite nel vitello

6.2 Lesioni nella Malattia delle Mucose

Il quadro anatomico-patologico della forma grave mortale, Malattia delle Mucose, si caratterizza per la disidratazione e l'emaciazione della carcassa e per lesioni fondamentali del tratto digerente e, in particolare, della cavità orale, dell'abomaso e dell'intestino (Marcato *et al.*, 2002).

6.2.1 Cavità orale ed esofago

Nella cavità orale si possono trovare lesioni erosive ed ulcerative, di forma irregolare, nelle gengive, nel palato (Fig. 6.2.1.1), nella lingua, all'interno delle guance, nella faringe, che spesso è ricoperta da un essudato grigiastro tenace. Queste lesioni originano da erosione ed espansione di piccoli focolai necrotici, lesioni pre-erosive che a loro volta si sono stabilite secondariamente a un'infezione catarrale acuta. Talvolta, erosioni ed ulcere confluiscono diffusamente, lasciando gran parte della mucosa priva di

rivestimento epiteliale e piuttosto arrossata per il denudamento del sottostante letto vascolare iperemico.



Fig. 6.2.1.1: lesioni erosive del palato duro

Nella lingua si rinvencono, sulle superfici laterali, le tipiche lesioni erosive irregolari. Talvolta, vi aderisce ancora l'epitelio necrotico in forma di membrane biancastre, pastose e facilmente asportabili. Lesioni erosive sono piuttosto frequenti anche nell'esofago.

6.2.2 Prestomaci e abomaso

Nei prestomaci si possono osservare lesioni necrotico-erosive ed ulcerative (Fig. 6.2.2.1.e 6.2.2.2). Nel rumine sono disseminate, evidenti soprattutto sui pilastri e nelle zone non villose della superficie interna. Nell'omaso interessano i margini delle lamine, dove talvolta causano perforazioni. Le lesioni possono iniziare come piccoli focolai necrotici, in leggero rilievo, con l'aspetto di membrane opache friabili. In seguito, tali focolai possono confluire e, per distacco degli epitelii necrotici, si trasformano in erosioni. Talvolta compaiono ulcere a margini netti, con fondo iperemico o emorragico.

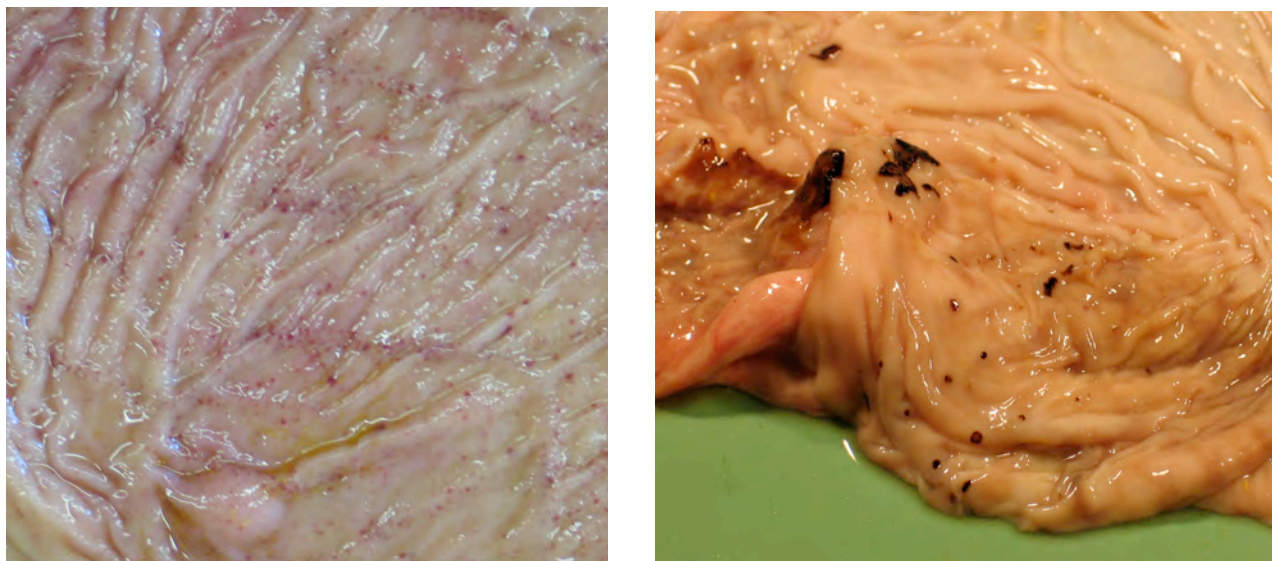


Fig. 6.2.2.1.e 6.2.2.2: lesioni necrotico-erosive dei prestomaci

Nelle mucose della cavità orale, dell'esofago e dei prestomaci, le cellule epiteliali vanno incontro in un primo momento a processi regressivi, che cominciano come degenerazione globiforme o palloniforme, manifestazione di necrosi indotta dall'azione citocida virale.

La necrosi si manifesta a focolai, che si estendono a ventaglio. Le lesioni sono infiltrate di granulociti e diventano rilevate sulla superficie sia per l'accumulo degli strati necrotici, che non si sfaldano, sia per la tumefazione spongiforme dell'epitelio necrotico. All'inizio lo strato basale non è coinvolto da questi fenomeni, ma quando, successivamente, viene raggiunto e distrutto dalla necrosi e si distacca insieme agli strati superiori, si forma un'ulcera che suscita una risposta infiammatoria nella sottomucosa.

Le lesioni all'abomaso sono costanti e caratterizzate da emorragie, erosioni di 1-10 mm o più di diametro ed ulcere, che appaiono abbastanza profonde nella regione pilorica.

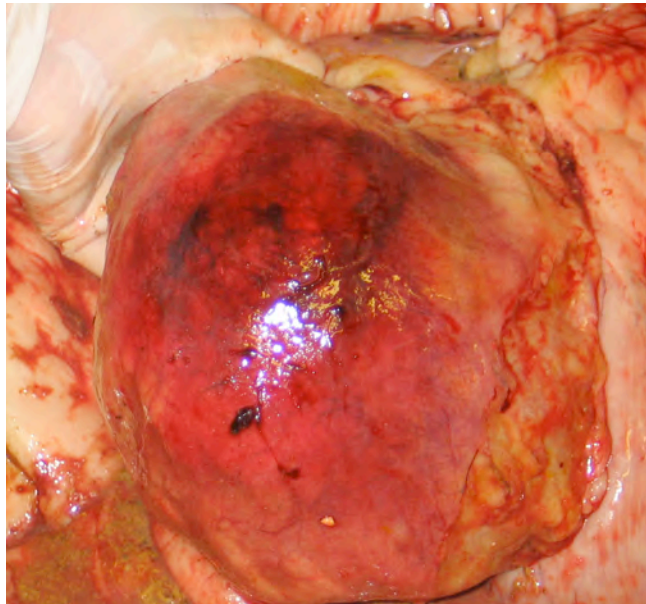


Fig. 6.2.2.3: emorragia abomasale

6.2.3 Intestino

Nell'intestino si trovano lesioni aspecifiche diffuse e lesioni specifiche circoscritte alle Placche di Peyer. Reperto costante, è un'enterite catarrale, accentuata nel digiuno e nell'ileo. Si notano, inoltre, fenomeni iperemici ed edematosi della parete e fini spruzzature della parete, che possono essere intensamente disseminate nel cieco (Fig. 6.2.3.1).

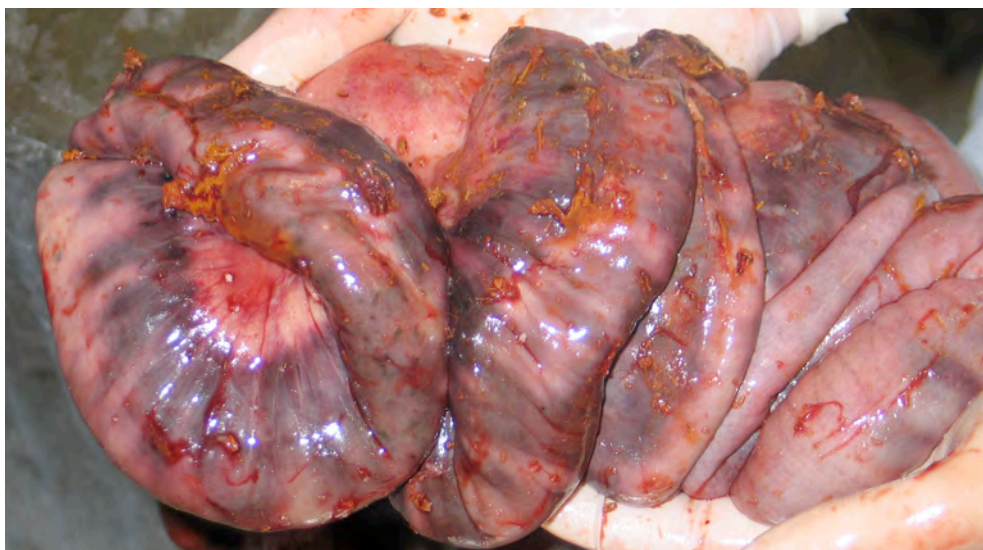


Fig. 6.2.3.1: iperemia della parete intestinale

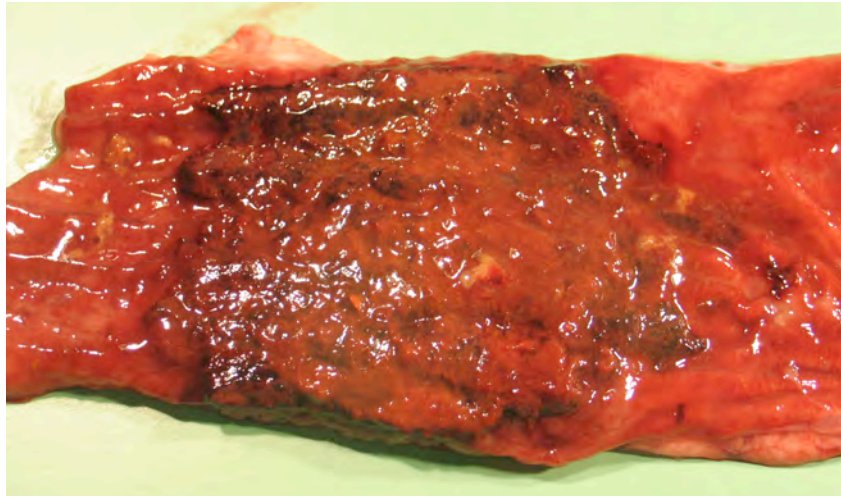


Fig. 6.2.3.2: colitiflite emorragica

Nel grosso intestino le lesioni variano, nei casi acuti, da semplici fenomeni congestizi della mucosa a una colitiflite fibrino-emorragica, mentre nelle forme croniche, da un'inflammatione fibrinosa a una fibrino-necrotica e ulcerativa (colitiflite difterioide ulcerativa). Una colite cronica difterioide a focolai è attribuita anche a sovrinfezione batterica (gen. *Salmonella*), analogamente a quanto si verifica nella Peste suina acuta e cronica.



Fig. 6.2.3.3: ulcera del grosso intestino

Talvolta, infezioni concorrenti da BVDV e batteri del genere *Salmonella* causano una gravissima colite acuta emorragico-necrotica.

Le lesioni istologiche intestinali sono piuttosto significative visto lo spiccato tropismo dei ceppi citopatogeni di BVDV per il GALT (*Gut associated lymphoid tissue*) e per l'epitelio delle cripte ghiandolari. Nella fase acuta, le alterazioni primarie sono una necrosi di questo epitelio e del tessuto linfoide; mentre nella mucosa si manifesta una reazione infiammatoria acuta con accumulo di muco e/o fibrina e neutrofili in superficie ed infiltrazione prevalentemente di mononucleati nella lamina propria, dove si evidenziano anche intensa congestione ed emorragie. Successivamente, le cripte non distrutte si riempiono di muco, di detriti epiteliali e di neutrofili e diventano ectasiche (ascessi criptici).

La distruzione delle ghiandole, che occorrono specialmente nel tratto distale del tenue e nel grosso intestino, e la lisi del tessuto linfoide concorrono a determinare avvallamenti erosivi della mucosa che corrispondono alle lesioni ulcerative di evidenza macroscopica (Marcato, 2002).

6.2.4 Sistema immunoemopoietico

Nella forma acuta si ha tumefazione, congestione ed emorragia dei linfonodi della testa e del collo.

Alcuni ritengono tipica della BVD un'ipotrofia della milza, il cui volume e spessore appaiono diminuiti sensibilmente.

Istologicamente, nei linfonodi e nella milza si nota una rarefazione delle cellule linfoidee e si può anche evidenziare necrosi dei centri germinativi con deposito di materiale ialino-fibrinoide. Nelle zone coricali dei linfonodi, inoltre, è rilevabile una proliferazione di cellule reticolari e focolai di mielopoiesi extramidollare. Anche nel timo si ha atrofia per rarefazione linfocitaria con addensamento collagene dello stroma e proliferazione di cellule reticolari.

Negli animali affetti da BVD-MD vi è uno stato di immunodepressione direttamente causato dal virus con diversi meccanismi: lesioni regressivo-necrotiche dei tessuti linfoidei; alterazioni funzionali dei monociti-macrofagi e dei granulociti neutrofili con

deficit dell'attività viricida e della capacità di mediare la reazione citotossica anticorpo-dipendente verso le cellule infettate da BVDV.

6.2.5 Cute

Le alterazioni cutanee, in modo analogo a quelle dei rivestimenti del tratto digerente costituite da epitelio pavimentoso stratificato cheratinizzato, prendono inizio con una necrosi dello strato spinoso che si estende spesso in profondità, oltrepassando talvolta lo strato basale, con comparsa di minute erosioni o ulcerazioni.

Nella forma acuta di MD, sintomi, seppur incostanti, sono una dermatite essudativa localizzata in regioni con cute sottile (perineo, scroto, mammella) e zoppia causata da laminite acuta (pododermatite asettica diffusa), da dermatite interdigitale ulcerativa e da cercinite ulcerativa. Nella forma cronica, l'insorgenza di una laminite cronica, di una dermatite interdigitale cronica flemmonosa (flemmone interdigitale) e di una cercinite ulcerativa cronica porta a zoppia.

6.3 Esame microscopico

Epitelio cheratinizzato: le alterazioni istopatologiche che riguardano l'epitelio cheratinizzato consistono inizialmente in infiltrazioni di monociti e macrofagi tra gli strati papillare e reticolare del derma. Il tessuto può apparire iperemico con diapedesi emorragica. Nell'epidermide si verificano una degenerazione e una necrosi delle cellule dello strato spinoso che portano alla distruzione delle giunzioni intercellulari. Lo strato corneo può perdere la sua integrità mentre lo strato basale rimane per lo più integro. In alcune aree cutanee si verificano processi di ipercheratosi. I follicoli piliferi e le ghiandole sudoripare vengono interessati solo tardivamente da processi di degenerazione e necrosi (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

Intestino: nell'intestino e nell'abomaso le lesioni si localizzano a livello del fondo e delle cripte. Le cellule vanno incontro a processi di vacuolizzazione e desquamazione. Le cripte ed i villi intestinali, soprattutto quelli localizzati a livello delle placche del Peyer, vanno incontro ad atrofia. Nella lamina propria si ha una forte infiltrazione di leucociti mononucleati e nello strato sottoepiteliale si verificano edema, iperemia e diapedesi emorragica (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

Organi linfoidi: nelle forme acute il timo mantiene la propria struttura mentre nelle forme subacute-croniche si verifica una perdita progressiva dell'organizzazione dell'organo. Le placche del Peyer, nelle forme iperacute, presentano una forte deplezione linfocitaria e tali strutture vengono progressivamente sostituite da tessuto fibrotico. Nelle forme croniche le placche del Peyer vanno incontro ad atrofia. Nei linfonodi si verifica una forte riduzione della componente linfocitaria e una regressione dei centri germinativi. Nella milza si verificano processi simili a quelli che si riscontrano a livello linfonodale ma meno pronunciati (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

CAPITOLO 7. IMMUNITÀ

7.1 La risposta immunitaria durante l'infezione virale

Le colture cellulari, fondamentali per lo studio dei virus, rappresentano tuttavia un mezzo limitato per il potenziale moltiplicativo dei virus. Questi microrganismi, infatti, si sono evoluti per sopravvivere in un ambiente avverso composto da ospiti multicellulari, geneticamente diversi e che possiedono potenti meccanismi di difesa innati ed acquisiti (Flint *et al.*, 2000).

La prima linea di difesa, fisica e chimica, è rappresentata dalla pelle, dalle secrezioni mucose, dal pH acido e dal flusso mucociliare. Quando le barriere fisiche e chimiche vengono oltrepassate, entra in gioco il sistema immunitario.

L'importanza fondamentale del sistema immunitario nella difesa dai virus è ampiamente documentata dalle devastanti infezioni virali che si osservano in soggetti che mancano di una adeguata funzione immunitaria per esempio per difetti genetici o nei soggetti affetti da AIDS.

Un ruolo importante nel contrastare l'infezione virale, è svolto dalla risposta infiammatoria, scatenata da cellule e tessuti danneggiati soprattutto dai virus citopatogeni. La risposta immunitaria nei confronti dei virus, però consiste soprattutto in una difesa innata, non specifica, e in una difesa acquisita, specifica.

La risposta immunitaria innata è composta in parte da potenti attivatori di proteine chiamate **citochine** che partecipano ad ogni fase della risposta immunitaria durante l'infezione virale, controllando i processi infiammatori, inducendo uno stato antivirale nelle cellule e regolando la risposta immunitaria acquisita. Ad oggi sono conosciute più di 35 citochine tra le quali, gli interferoni (INFs), svolgono un ruolo fondamentale nella risposta all'infezione virale (Flint *et al.*, 2000).

In Tab. 1 sono riportate le funzioni di alcune citochine della risposta immunitaria che intervengono durante l'infezione virale.

citochina	sorgente	Target/azione
<i>Inf-γ</i>	Cellule T/cellule NK	Attiva i macrofagi, inibisce l'effetto di IL-6; induce uno stato antivirale
<i>Inf-α/β</i>	Diversi tipi di cellule	Induce uno stato antivirale; inibisce la proliferazione cellulare; stimola le cellule NK; aumenta l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I); inibisce l'espressione di MHC II
<i>Tnf-α</i>	Cellule T/macrofagi	Attiva i neutrofili; induce la risposta infiammatoria e la febbre; potenzia la lisi di alcune cellule infettate dal virus
<i>IL-1</i>	Macrofagi, cellule T e B cellule epiteliali	Induce la risposta infiammatoria; causa deperimento (cachessia); induce la sintesi epatica di proteina di fase acuta
<i>IL-2</i>	Cellule T	Induce la proliferazione di cellule T; stimola i NK; induce la sintesi di Ab
<i>IL-3</i>	Cellule T helper	Fattore stimolante della crescita e differenziazione dei precursori cellulari del midollo
<i>IL-4</i>	Mastociti, midollo	Induce la proliferazione e differenziazione delle cellule B; inibisce i macrofagi; blocca l'effetto di <i>Inf-γ</i> sui macrofagi; stimola i linfociti T helper 2
<i>IL-5</i>	Cellule T helper 2	Induce la differenziazione delle cellule B; aumenta l'attività degli eosinofili
<i>IL-6</i>	Macrofagi, cellule T, cellule endoteliali vascolari, fibroblasti	Stimola le cellule B; e costimola le cellule T
<i>IL-7</i>	Cellule stromali del midollo	Induce la differenziazione delle cellule B
<i>IL-8</i>	Diversi tipi di cellule	Attività chemiotattica sui neutrofili; induce una maggior espressione delle molecole d'adesione; induce angiogenesi e inibisce la proliferazione di cellule mieloidi
<i>IL-10</i>	Cellule B e T	Induce la differenziazione delle cellule B; inibisce i macrofagi, effetto antinfiammatorio
<i>IL-12</i>	Macrofagi, monociti	Stimola le cellule NK; induce la differenziazione di Th in Th 1 e dei CD8+ in CTLs

Tab. 7.1.1: citochine coinvolte nella risposta immunitaria nei confronti dei virus (da Flint *et al.*, 2000 modificata).

Tra le citochine, gli INFs, scoperti da Isaacs e Lindenmann nel 1957, svolgono un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria contro i virus. Gli INFs sono glicoproteine distinguibili in due grandi categorie: INF-I e INF-II.

L'INF-I è suddiviso in INF- α e INF- β ; la prima classe è rappresentata da una famiglia di molecole derivate dalle cellule T helper e cellule dendritiche mentre la seconda deriva da fibroblasti infettati.

Interferon α/β sono rilasciati dalle cellule infettate dal virus poche ore dopo l'infezione e alte concentrazioni di INFs possono essere riscontrate *in vivo* entro i primi giorni dell'infezione, molto prima dello sviluppo della risposta immunitaria acquisita. Ad esempio, in bovini inoculati con hepesvirus tipo 1 il picco di INF nel siero si ha due giorni dopo l'infezione dopo di che inizia a calare il suo livello pur rimanendo evidenziabile fino a 7 giorni post infezione. Al contrario, i livelli di anticorpi non sono evidenziabili fino a 5/6 giorni dopo l' inizio dell'infezione virale.

Un'altra classe di INF-I è rappresentato da INF- ω prodotto dal trofoblasto embrionale.

Forme distinte dall'INF-I sono l'INF- τ , che è stato isolato dal trofoblasto dei ruminanti, e l'INF- δ isolato dal trofoblasto di suini.

Dell'INF-II esiste invece un solo tipo, l'INF- γ , una citochina derivata in primo luogo da cellule T stimulate dall'antigene (Tizard , 2004)

Questa citochina regola la risposta antigene specifica e svolge il suo effetto sulle Antigen presenting Cells (APCs) e sui linfociti T e B, essa ha inoltre un ruolo proinfiammatorio in quanto attiva macrofagi e cellule endoteliali ed è in grado di aumentare l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (MCH).

La produzione di INF- γ è prerogativa dei linfociti T helper di tipo I. L'attività antivirale di tale citochina è inferiore rispetto all'INF α e β ma, come tali molecole, è in grado di indurre una depressione del gene 2',5'-oligoadenilsintetasi e della protein chinasi dsRNA-dipendente che attribuiscono un largo spettro antivirale alle cellule.

La produzione di INFs è innescata dalla associazione tra l'acido nucleico del virus e i ribosomi cellulari, che esita nella attivazione dei geni codificanti per l'INF. Gli INFs stimolano, infatti, la produzione di oltre 100 nuove proteine, innescando così uno "stato antivirale". Ad esempio, l'INF α/β regolano la trascrizione del gene 2'5'-oligoadenilato sintetasi (2'5'OAS) attivato dalla presenza di dsRNA. Gli enzimi espressi dal gene 2'5'-oligoadenilato sintetasi agiscono sull'adenosin trifosfato (ATP) per formare oligomeri

2'5' adenilati, 2'-5'-oligo(A), che attivano una ribonucleasi latente (RNase L) in grado di degradare l'RNA virale inibendo la crescita virale.

Il segnale inviato dall'INF porta, inoltre, ad un drastico aumento della protein chinasi (Pkr) nella sua forma inattiva, la quale viene poi attivata da ds-RNA virali. La protein-chinasi fosforila un fattore chiamato eIF2 che inibisce la sintesi delle proteine virali prevenendo l'inizio della traslazione dell'mRNA.

Un altro enzima indotto soprattutto dall'INF- γ e prodotto dai macrofagi attivati, è l'ossido nitrico sintetasi, che ha molteplici effetti, tra i quali, quello di inibire la replicazione di poxvirus e herpesvirus. Alcune proteine indotte dagli INFs hanno un'attività antivirale molto specifica, a differenza delle altre proteine viste prima che hanno un più ampio spettro d'azione. Tra queste la proteina Mx1 che fa parte di una piccola famiglia di GTPases con potenti attività nei confronti di virus a RNA a polarità negativa. La proteina Mx1 nel topo e la proteina MxA nell'uomo hanno una spiccata attività antivirale nei confronti del virus dell'influenza. MxA dell'uomo ha inoltre attività specifica nei confronti di del virus della stomatite vescicolare, del morbillo, del virus della parainfluenza 3 e di alcuni bunyavirus (Flint *et al.*, 2000).

Altre importanti funzioni della risposta immunitaria innata sono svolte dal **sistema complemento** che, una volta attivato distrugge le cellule infettate, particelle virali e altri microbi e dalle cellule **natural killer** (NK), che rappresentano una abbondante e distinta popolazione di linfociti; tali cellule nell'uomo, sono importanti nel controllo di infezioni da herpesvirus.

La risposta immunitaria acquisita, invece, consiste nella **risposta anticorpale**, umorale, e nella risposta **cellulo mediata** che dipendono da due gruppi di cellule: i linfociti B e T e le antigen-presenting cells (APCs), che includono le cellule di Langherans nella cute, le cellule del Kupffer nel fegato, le cellule dendritiche nei linfonodi e nelle mucose, macrofagi e cellule B (Fig. 7.1.1).

I meccanismi della risposta immunitaria acquisita umorale si innescano quando avviene l'interazione tra i precursori dei linfociti B e l'antigene. Questo legame porta infatti alla differenziazione in cellule secernenti anticorpi (plasmacellule). Per quanto riguarda invece la risposta cellulo mediata, il processo è innescato quando i linfociti T riconoscono l'antigene esposti sulla superficie della cellula tramite il complesso maggiore di istocompatibilità.

La sottopopolazione dei linfociti T helper (CD4+) riconosce gli antigeni legati al complesso MCH II e produce citochine che promuovono o inibiscono la divisione cellulare o l'espressione dei geni. La sottopopolazione dei linfociti T citotossici (CD8+), che riconoscono gli antigeni esposti sul MCH I, una volta attivati dai T helper, si differenziano in linfociti CTLs con la funzione di distruggere le cellule infettate dal virus (Tab. 2)

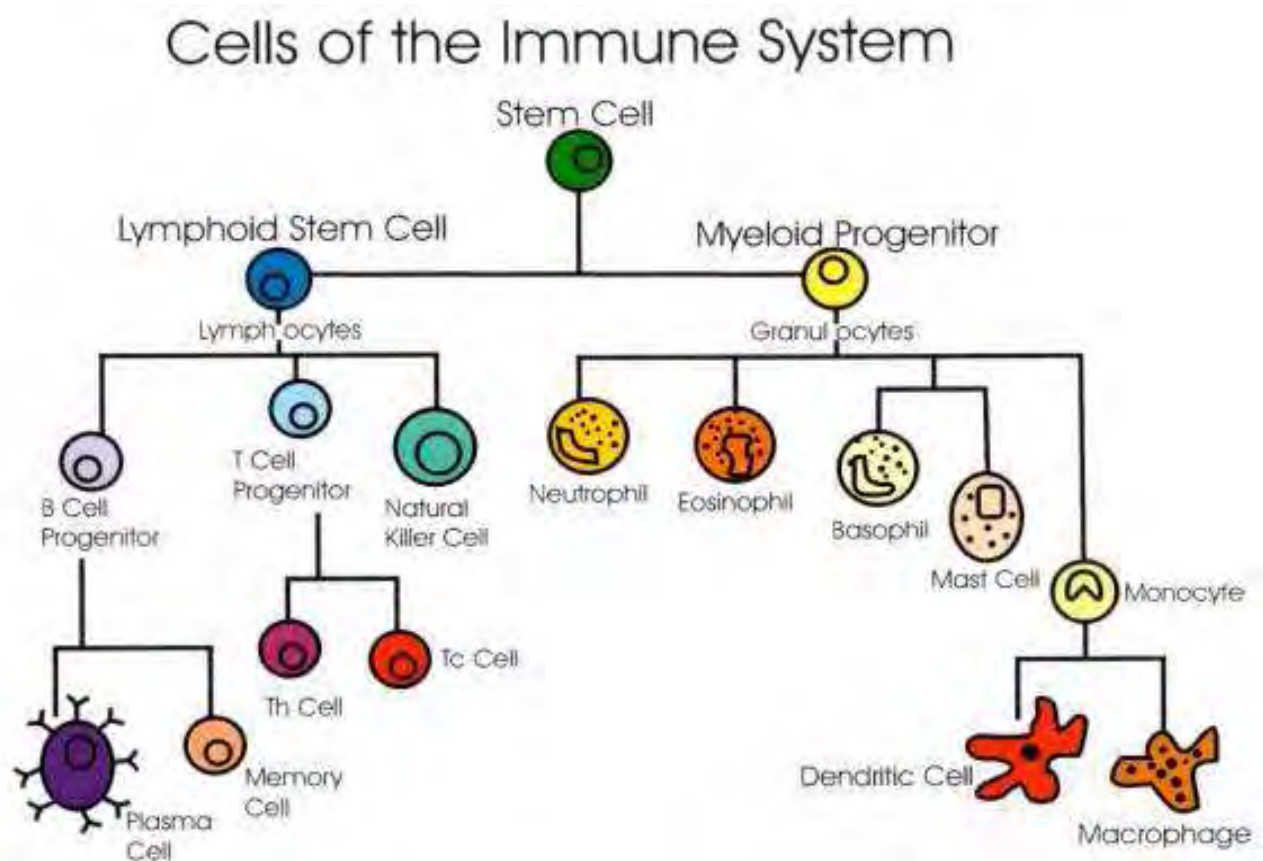


Fig. 7.1.1. Cellule del sistema immunitario
<http://www.biologymad.com/Immunology/Immunology.htm>

Risposta	Effettori	Attività
Cellulo-mediata	Secrezione di INF-γ da cellule Th e linfociti T citotossici (CTLs)	Induzione dello stato antivirale
	Linfociti T citotossici (CTLs)	Distruzione delle cellule infette
	NK e macrofagi	Distruzione delle cellule infette direttamente o attraverso la citotossicità cellulo mediata anticorpo dipendente
Umorele	Ab (IgA)	Inibizione dell'attachement tra virus e ospite
	Ab (IgG)	Inibizione della fusione dei virus con envelope alla membrana cellulare
	Ab IgG e IgM	Aumento della fagocitosi (opsonizzazione) dopo il legame con i virioni
	Ab IgM	Agglutinazione dei virioni
	Attivazione del complemento (IgG e IgM)	Lisi dei virus con envelope; opsonizzazione tramite il sistema complemento (complesso C3b-Ab)

Tab. 7.1.2: risposta immunitaria umorale e cellulo mediata nei confronti dei virus (Flint *et al.*, 2000 modificata)

7.2 La risposta immunitaria nei confronti del BVDV

A differenza di alcuni batteri come i bacilli che producono spore, i virus hanno una scarsa capacità di sopravvivere all'esterno dell'ospite, quindi, hanno sviluppato due differenti strategie per rimanere all'interno dell'organismo ospite.

Un virus può provocare, infatti, un'infezione persistente nell'animale contagiato tramite il quale può infettare nuovi soggetti oppure, può utilizzare la strategia "hit-and-run" caratterizzata da una infezione di breve durata nell'ospite e il trasferimento ad un altro ospite recettivo.

L'infezione transitoria riflette questa strategia di "hit-and-run" poiché gli animali acquisiscono l'immunità che, in alcuni casi, può perdurare per tutta la vita dell'animale. La seconda strategia consiste nel causare un'infezione persistente "infect-and-persist" come accade per esempio nelle infezioni da HIV e Herpes virus. A differenza dei virus

che sfruttano la strategia “hit-and-run”, i virus che utilizzano la strategia “infect-and-persist” hanno sviluppato sofisticati meccanismi per evadere le difese dell’ospite. (Peterhans *et al.*, 2003).

Il virus della Diarrea Virale bovina ha sviluppato entrambe le strategie sopra descritte avendo la capacità di determinare sia un’infezione transitoria che produce una risposta immunitaria da parte dell’ospite, sia un’infezione persistente. Questo meccanismo di infezione è decisamente particolare e unico tra i virus capaci di produrre un’infezione persistente. Il BVDV, infatti, determina infezione persistente infettando il feto nei primi stadi dello sviluppo intrauterino causando un’immunotolleranza specifica per il ceppo infettante.

Lo studio dello stato d’immunodepressione, sia nei soggetti con infezione acuta sia nei soggetti persistentemente infetti e il ruolo delle cellule infettate nel controllo della risposta immunitaria ed acquisita, costituiscono per questa malattia, la chiave di lettura per comprendere il continuo cambiamento dell’interazione tra virus e ospite (Chase *et al.*, 2004).

Il BVDV infetta le cellule del sistema immunitario innato, provocando disfunzioni funzionali nei neutrofili, monociti, macrofagi e cellule dendritiche. *In vitro*, un numero variabile di monociti vengono infettati e producono progenie virali, diventano apoptotici qualora infettati da ceppi di BVDV cp e producendo fattori solubili che causano l’apoptosi in monociti e linfociti non infetti (Glew *et al.*, 2003). *In vivo* si assiste ad una diminuzione fino al 30-70% del numero di monociti in vitelli infettati da ceppi virulenti di BVDV.

Poiché i fagociti mononucleari (monociti e macrofagi) sono cellule importanti sia perché sono cellule target del BVDV sia per la regolazione del sistema immunitario, sono stati eseguiti diversi studi riguardo alla replicazione di ceppi cp e ncp del BVDV in macrofagi differenziati *in vitro* da cellule del midollo fetale.

In Tab. sono riportati gli effetti in vitro dell’infezione da BVDV sulla funzione dei macrofagi.

EFFETTO	BVDV Ncp	BVDV Cp
Sintesi INF-1	=	+
Induzione dell'apoptosi	=	+
Sintesi della prostaglandina E2	=	+
Chemiotassi indotta da citochine	-	-
NO sintesi dopo trattamento con LPS	+	-
TNF- α sintesi dopo trattamento con LPS	-	-
Produzione di superossido indotta da PMA	-	-
Induzione all'attività procoagulante	=	=
Inibizione dell'attività di IL-1 indotta da LPS	+	+

Tab. 7.2.1: effetto dell'infezione da BVDV, *in vitro*, sulla funzione di macrofagi bovini (Peterhans *et al.*, 2003)

L'interferon tipo I (INF) o α/β interferons (INF α/β) sono una importante difesa dell'organismo contro le infezioni virali. Una volta sintetizzato e secreto dalla cellula infetta, l'INF si lega al recettore sulla superficie di cellule infette e non infette inducendo una "stato antivirale".

Diversi studi hanno dimostrato che ceppi ncp, a differenza dei ceppi cp, non inducono l'espressione di INF tipo I *in vitro* (Adler *et al.*, 1997) e che tali ceppi hanno la capacità di determinare un blocco dell'induzione di INF da parte di altri attivatori come i ds-RNA e virus.

Uno studio effettuato da Charleston *et al.*, (2001) effettuato *in vivo* ha dimostrato una mancata produzione di INF nel liquido amniotico di feti infettati con ceppi ncp, mentre, l'INF è stato rilevato nel liquido amniotico di feti infettati con ceppi cp. Allo stesso tempo, una banda specifica della proteina Mx, indicante la bioattività dell'INF, è stata riscontrata tramite Western blot dai campioni di milza fetale al 5 e 7 giorno post infezione con ceppi cp mentre, solo una esile banda è stata riscontrata in campioni di milza di feti infettati col ceppo ncp, nonostante l'evidenziazione, tramite isolamento virale, di una replicazione maggiore di tale ceppo rispetto al cp.

Altri esperimenti sono stati svolti al fine di indagare i meccanismi di evasione del sistema immunitario da parte dei ceppi ncp.

Schweizer e Peterhans (2001), hanno dimostrato che l'aggiunta di un dsRNA sintetico, la poly(IC), a cellule infettate almeno 6-12 h prima con un ceppo di BVDV ncp non causa la morte cellulare anche alle più alte concentrazioni di poly(IC). Questo dimostra che l'espressione di proteine cellulari o virali indotte dal virus sono necessarie per l'effetto inibitorio dei ceppi ncp.

Inoltre, da tale studio, risulta che la sintesi di INF indotta da poly(IC) viene completamente inibita in macrofagi infettati da BVDV ncp.

Alla luce del ruolo chiave dell'INF nello scoppio della risposta immunitaria acquisita, per l'attivazione delle cellule NK e dei macrofagi, per l'aumento dell'espressione di MCH-I sulle cellule target e per l'attivazione delle cellule T, è stato ipotizzato che la mancata produzione di INF potrebbe essere cruciale per lo stabilirsi dell'immunotolleranza e per la persistenza di ccp nel feto in sviluppo dal 40° al 120° giorno di gestazione (Adler *et al.*, 1997).

La domanda che molti ricercatori si sono posti è : “Perché solo durante questa finestra temporale si sviluppa la persistenza e l'immunotolleranza?”. A questa domanda è stato risposto ipotizzando la presenza di cellule diverse e non ancora presenti nel feto durante il periodo critico dello sviluppo intrauterino. L'insuccesso dei ceppi ncp nel produrre infezione persistente nei primi 40 giorni sarebbe invece dovuto alla presenza di INF- τ , prodotto dal trofoblasto bovino, che ha la funzione di mantenere la gestazione e per prevenire la luteolisi (Peterhans *et al.*, 2003).

Le cellule che presentano l'antigene (APC: cellule dendritiche, macrofagi e monociti), rivestono un ruolo fondamentale per l'induzione e il controllo della risposta immunitaria. Le cellule APC, infatti, internalizzano l'antigene e presentano i peptidi alle cellule T helper sfruttando il sito di legame dei peptidi associato al complesso maggiore di istocompatibilità II (MHC II).

Le cellule APC infettate da BVDV mostrano una riduzione di recettori implicati nell'attività fagocitaria (Welsh *et al.*, 1995; Adler *et al.*, 1997).

L'infezione dei monociti, inoltre, riduce la loro capacità di presentare l'antigene alle cellule T helper. Le cellule dendritiche invece, non presentano una riduzione della capacità di presentare l'antigene alle cellule T helper e dell'espressione dei marker della superficie cellulare.

Cambiamenti cellulari e/o delle citochine	Effetto sul sistema immunitario	Effetto sulla risposta dell'animale ad altre infezioni
↓ chemiotassi	↓ migrazione neutrofili	↑ 2° infezioni batteriche
↓ Fc, espressione recettore CD14 e complemento	↓ fagocitosi	↑ 2° infezioni batteriche
↓ fagocitosi	↓ microrganismi fagocitati	↑ 2° infezioni batteriche
↓ TNF-α	↓ produzione citochine infiammatorie	↓ immunità innata e acquisita
↑ inibitori IL-1	↓ produzione citochine infiammatorie e cellule T	↓ immunità innata e acquisita
↓ produzione superossido	↑ crescita microbica	↑ 2° infezioni batteriche
↓ attività microbica		
↓ produzione INF da ceppi Ncp	↓ risposta antivirale	Evasione sistema immunitario
↑ produzione INF da ceppi cp	↑ risposta antivirale	Apoptosi e morte delle cellule infette

Tab. 7.2.2: effetto del BVDV sul sistema immunitario innato (Chase *et al.*, 2004)

Per quanto riguarda invece la risposta immunitaria acquisita e, in particolare, quella cellulo-mediata, durante l'infezione da BVDV, si osserva una riduzione dei linfociti T dipendente dal ceppo infettante; tale riduzione può andare da 10-20% al 50-60% con ceppi ncp altamente virulenti.

Anche le sottopopolazioni dei linfociti T subiscono l'infezione da parte di BVDV, sia CD8+ che i linfociti T CD4+.

A livello microscopico si osserva una deplezione dei linfociti T nei follicoli linfoidi delle tonsille e linfonodi con ceppi ipervirulenti di BVDV ncp, mentre deplezione dei follicoli linfoidi delle Placche del Peyer si osserva sia nei casi di MD che nelle infezioni da ceppi ncp altamente virulenti (Liebler-Tenorio *et al.*, 2003).

I linfociti CD4+ svolgono un ruolo fondamentale nella coordinazione della risposta cellulo-mediata nelle prime fasi dell'infezione. Le risposte dei CD4+ sono rivolte in primo luogo nei confronti delle proteine NS3 e E2 del BVDV ma anche nei confronti

della proteina del capside C, la glicoproteina E^{ns}, la proteinasi Npro e la proteina non strutturale NS2-3.

La proliferazione di CD4⁺ avviene più velocemente nelle infezioni con ceppi cp rispetto ai ceppi ncp e la popolazione maggiormente implicata è quella dei Th1.

I ceppi ncp invece, inducono una maggiore attivazione dei linfociti CD4⁺ Th2 causando una produzione maggiore di anticorpi. Tale induzione è caratterizzata da alti livelli di fattori di crescita per le cellule B e una maggiore attività dell'interleuchina 4.

Anche la popolazione di linfociti CD8⁺ subisce una proliferazione durante l'infezione da BVDV che induce la produzione di IL-2 e INF- γ .

L'infezione da BVDV nei confronti delle cellule della risposta umorale causa una deplezione dei linfociti B nei follicoli linfoidi dei linfonodi e delle placche del Peyer (Liebler-Tenorio *et al.*, 2003). Collen e Morrison, (2000) hanno dimostrato che durante l'infezione acuta da BVDV viene innescata la produzione dei linfociti T CD4⁺ e dei linfociti T CD8⁺. Sembra che i biotipi cp provochino una linfoproliferazione precoce di tali cellule che si verifica in 3-4 settimane dall'infezione, mentre a seguito dell'infezione con i biotipi non citopatogeni la linfoproliferazione è più lenta e avviene in 6-8 settimane. È stato inoltre dimostrato che soprattutto i linfociti T CD4⁺ giocano un ruolo fondamentale nella risoluzione dell'infezione; la deplezione di questo tipo di cellule prolunga, infatti, l'eliminazione del virus con le secrezioni nasali durante l'infezione acuta (Howard *et al.*, 1992). Sembra, inoltre, che entrambi i linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ riconoscano le cellule infettate dal virus, ma che solo i linfociti T CD4⁺ siano in grado di riconoscere anche gli antigeni virali non infettanti (Collen e Morrison, 2000).

La risposta immunitaria umorale è rivolta soprattutto verso la glicoproteina E2 che è altamente antigenica e causa la produzione di anticorpi neutralizzanti nell'ospite dopo l'infezione o vaccinazione con vaccini vivi attenuati o spenti. La risposta immunitaria è rivolta anche verso la proteina NS2-3; tali anticorpi possono cross reagire con gli altri pestivirus. Nei bovini recettivi l'infezione da parte del BVDV causa la produzione di anticorpi virus-specifici e gli anticorpi neutralizzanti compaiono generalmente 1-3 settimane dopo l'infezione e il titolo anticorpale raggiunge il picco massimo dopo 12 settimane. In alcuni animali la copertura anticorpale si riduce dopo pochi mesi dall'infezione mentre in altri soggetti può perdurare anche per tutta la vita proteggendo l'animale dalla reinfezione da parte di ceppi omologhi di BVDV (Brownlie, 1990).

Gli anticorpi prodotti, IgG, IgM e IgA, sono rivolti soprattutto contro le proteine strutturali E0 ed E2 e contro la proteina non strutturale NS2-3.

La glicoproteina E2 è la proteina immunodominante e gli anticorpi prodotti nei suoi confronti hanno una forte capacità neutralizzante. La proteina NS2-3, invece, presenta degli epitopi altamente conservati tra i *Pestivirus*; gli anticorpi prodotti contro tale proteina non hanno tuttavia attività neutralizzante e, quindi, non garantiscono la protezione dall'infezione (Douart e Simon, 1997).

Negli allevamenti in cui gli adulti sono sieropositivi, un'alta percentuale di vitelli possiede anticorpi neutralizzanti contro BVDV. La placenta dei ruminanti, essendo di tipo sindesmocoriale, non permette il passaggio di Ig al feto; i vitelli, quindi acquisiscono gli anticorpi specifici attraverso il colostro.

La protezione da un'eventuale infezione è notevole durante la prima settimana di vita, successivamente i vitelli svilupperanno, in caso di contatto col virus, una propria immunità attiva (Stober, 1984).

I soggetti infettati in modo transitorio o persistente da BVDV sono predisposti a infezioni da altri patogeni soprattutto a livello respiratorio da parainfluenza-3, bovine herpesvirus-1, virus sinciziale bovino, *Pasteurella haemolytica*.

I meccanismi di immunosoppressione da BVDV includono la riduzione della proliferazione linfocitaria (Brown *et al.*, 1991), l'aumento della produzione di prostaglandina E₂ (Van Reeth e Adair, 1997), decremento dell'attività microbica e della migrazione dei neutrofili, decremento delle immunoglobuline secrete nel torrente circolatorio, decremento dell'espressione del complemento della produzione di chemochine (Welsh *et al.*, 1995), decremento della chemiotassi e della fagocitosi. L'abilità di ceppi cp e ncp di indurre apoptosi *in vivo* dei linfociti B e T nei tessuti linfoidei, rappresenta un meccanismo immunosoppressivo di importanza critica.

Nella Tab. 4 sono riportati i maggiori effetti dell'infezione da BVDV sul sistema immunitario acquisito.

Cambiamenti cellulari e/o delle citochine	Effetto sul sistema immunitario	Effetto sulla risposta dell'animale ad altre infezioni
↓ espressione MHC II	↓ presentazione antigene	↓ risposta immunitaria acquisita
↓ espressione MCH I da ceppi ncp	↓ linfociti T citotossici	↑ evasione immunitaria e infezione virale
↑ attivazione di T helper da ceppi cp	↑ risposta linfociti T citotossici ↑ memoria cellule T	↑ risposta protettiva a lungo termine
↑ attivazione di T helper da ceppi ncp	↑ attivazione cellule B	↑ produzione Ab
		↓ risposta cellulo mediata

Tab. 7.2.3: effetti del BVDV sul sistema immunitario acquisito (Chase *et al.*, 2004)

CAPITOLO 8. DIAGNOSI

8.1 Diagnosi clinica e anatomo patologica

La grande variabilità delle manifestazioni cliniche associate al BVDV rende difficoltosa la sua diagnosi: la diarrea virale bovina può essere confusa con numerosi stati patologici; in molti casi, l'indagine clinica e anatomo-patologica riescono solo a fornire un sospetto che dovrà essere confermato tramite l'indagine di laboratorio (Castrucci, 1992).

Per utilizzare il miglior approccio diagnostico, il veterinario deve considerare attentamente il contesto in cui opera, dato che non tutti i test diagnostici sono applicabili in ogni situazione (Saliki e Dubovi, 2004).

Nei casi di malattia delle mucose acuta e cronica il quadro anatomo-patologico è particolarmente evocativo anche se non esaustivo; la necropsia evidenzia la presenza di erosioni della mucosa dell'apparato digerente oltre che lesioni congestizie, edematose o emorragiche e necrotiche; sono inoltre rilevanti le modificazioni infiammatorie riferibili a fenomeni di atrofia in corrispondenza delle placche del Peyer (Castrucci, 1992).

La presenza di turbe della riproduzione e di anomalie congenite dei vitelli possono far sospettare la presenza dell'infezione da BVDV in azienda. Il ripetuto ritorno in calore e il calo della fertilità, gli aborti enzootici, la mortalità embrionale e la mummificazione del feto, sono segnali importanti per formulare un sospetto di infezione acuta e transitoria da BVDV. Gli aborti sono precoci, verificandosi al massimo fino al 3°- 4° mese di gestazione e nel feto abortito o sulla placenta non si riscontrano segni evidenti (Douart e Simon, 1997).

Le sindromi emorragiche che si manifestano con tassi di mortalità elevati sia negli adulti che nei giovani animali possono indurre al sospetto di infezione da parte di BVDV tipo 2. Segni clinici minori sono rappresentati dal calo della produzione latte e da episodi febbrili moderati. Anche le forme di diarrea acuta e patologie polmonari che colpiscono soprattutto i giovani animali possono creare un sospetto di infezione da BVDV in atto (Douart e Simon, 1997).

8.2 Diagnosi differenziale

8.2.1 Forma gastroenterica

Peste bovina: in un paese indenne, la Peste bovina si esprime con caratteristiche cliniche che le conferiscono una gravità tale da non poter essere paragonata alla BVD. La peste bovina infatti è caratterizzata da un andamento iperacuto-acuto e da una morbidità e mortalità elevate. I sintomi clinici, in questo caso, sono rappresentati da reazione febbrile intensa, manifestazioni infiammatorie sulle mucose superficiali con necrosi e ulcerazioni dell'epitelio orale, seguite da gastro-enterite con diarrea sanguinolenta di odore nauseabondo. Nelle regioni endemiche la peste bovina si manifesta sotto forma atipica, nettamente meno grave, caratterizzata da lieve ipertermia, lesioni buccali modeste, enterite e diarrea poco apprezzabili. In tali casi la diagnosi differenziale con BVD risulta difficoltosa (Castrucci, 1992).

Afta: l'afta epizootica potrebbe essere confusa con BVD soltanto considerando gli animali individualmente e dopo la rottura delle vescicole del cavo orale. L'afta si distingue infatti per la sua grande contagiosità con possibile estensione del contagio agli ovini e ai suini, per la sindrome febbrile di breve durata ma intensa e per l'assenza di diarrea (Castrucci, 1992).

Febbre catarrale maligna: la diagnosi differenziale nei confronti della febbre catarrale maligna (FCM) può essere difficoltosa soprattutto nei casi in cui la BVD, in forma grave, sia caratterizzata da una evoluzione lenta. Tuttavia, la FCM presenta caratteri peculiari quali: l'incidenza è elevata soprattutto negli animali adulti, la localizzazione è prevalentemente oculare, respiratoria e vaginale, diarrea assente o tardiva.

Blue Tongue: di norma, la Blue tongue è inapparente nel bovino, ma occasionalmente si può manifestare una stomatite ulcerativa a livello cutaneo e podale. Elementi differenziali possono essere la comparsa contemporanea nelle pecore, la diffusione geografica, i caratteri diffusivi della necrosi della mucosa orale e della lingua, l'assenza di diarrea e di erosioni nella mucosa gastroenterica (Castrucci, 1992).

Altre stomatiti: possono presentare analogie con l'infezione da BVD la Stomatite papulosa che decorre in forma enzootica e colpisce elettivamente gli animali giovani, essa evolve in assenza di febbre e diarrea e può essere trasmessa all'uomo dove causa lesioni sulle mani (Malattia dei mungitori); la Stomatite ulcerosa da vaiolo bovino che

provoca un'eruzione vescicolo-pustolosa sulla mucosa del cavo orale e sulla cute della mammella; la Stomatite vescicolare che si riscontra solo occasionalmente nel bovino e che si contraddistingue per la sua evoluzione benigna e per l'aspetto tipicamente vescicolare delle lesioni; la Blue tongue che è di norma inapparente nel bovino, ma che può occasionalmente provocare una stomatite ulcerosa associata a localizzazione cutanea e podale. Le lesioni causate dalla Blue tongue possono creare problemi di ordine clinico nella diagnosi differenziale con la BVD; gli elementi differenziali sono rappresentati dalla comparsa della malattia nelle pecore, dall'assenza di diarrea e dai caratteri diffusivi della necrosi della mucosa orale e della lingua (Castrucci, 1992).

Altre enteriti: possono essere confuse con BVD le enteriti virali da *rotavirus*, *parvovirus* e *coronavirus* che però colpiscono quasi esclusivamente gli animali neonati o molto giovani. Le enteriti tossiche che si manifestano in assenza di lesioni buccali e con sintomi nervosi, epatici o renali. Le enteriti parassitarie da coccidi o strongili gastro-intestinali. Le enteriti batteriche da *E.coli* e *Salmonella*, caratterizzate da un andamento enzootico e che colpiscono soprattutto i vitelli giovani e l'enterite da *Mycobacterium paratuberculosis*, caratterizzata da un periodo di incubazione particolarmente lungo e che decorre senza febbre né lesioni della mucosa buccale (Castrucci, 1992).

8.2.2 Forma respiratoria:

Febbre catarrale maligna: i segni respiratori sono la conseguenza di una infiammazione prima catarrale poi mucopurulenta e necrotica, spesso associata a rinite, sinusite e laringo-tracheite. I sintomi respiratori sono molto più gravi rispetto a quelli associati all'infezione da BVD.

Rinotracheite infettiva: gli elementi differenziali a favore della IBR sono l'elevata morbilità e la sintomatologia essenzialmente respiratoria. Le analogie tra BVD e IBR sono la presenza di congiuntivite e cheratite e la possibilità di aborti.

Parainfluenza 3: la forma clinica ordinaria di PI-3 può essere differenziata da BVD sulla base della contagiosità elevata, dei sintomi di tracheo-bronchite catarrale e per l'assenza di disturbi dell'apparato digerente (Castrucci, 1992).

8.2.3 Forma riproduttiva:

Neospora caninum: questo protozoo può causare aborto nelle bovine gravide e, più di rado, turbe nervose nei vitelli neonati. L'aborto da neosporosi si osserva più frequentemente dal 4° al 6° mese di gravidanza, le affezioni neonatali più frequentemente osservate sono encefalomyelitis e miocardite.

Brucella abortus: l'aborto provocato da *Brucella abortus* si verifica tra il 4° e l'8° mese di gravidanza a causa di una placentite, sono inoltre frequenti ritenzioni placentari.

Chlamydia psittaci: nelle infezioni naturali l'aborto da *Chlamydia* non si verifica prima del 5° mese e può essere seguito da ritenzione placentare. Il feto può presentare edemi sottocutanei, petecchie su timo, sierose e sottocute e un aumento del volume dei linfonodi.

Campylobacter fetus fetus, Campylobacter fetus venerealis: *Campylobacter fetus venerealis* causa, come sintomo più evidente calo della fertilità e ritorni in calore. L'aborto si manifesta di solito tra il 5° e il 6° mese di gravidanza, ma talvolta, può riscontrarsi prima o quasi al termine della gestazione. Si apprezzano lesioni macroscopiche del feto edemi del connettivo sottocutaneo, presenza di liquido emorragico nelle cavità splanchniche e necrosi epatica. *Campylobacter fetus fetus* provoca, invece, un aborto sporadico che solitamente si verifica a gravidanza inoltrata.

8.2.4 Forma emorragica:

La diagnosi differenziale della forma emorragica va fatta con tutte le patologie in cui si verifica trombocitopenia sia quando questa è determinata da una riduzione della vita delle piastrine sia quando si ha una diminuzione della produzione di trombociti da parte del midollo osseo. Le malattie infettive possono esitare nel fenomeno della coagulazione intravasale disseminata (DIC) durante la quale si assiste ad un consumo ed esaurimento delle piastrine. La trombocitopenia come componente di DIC è stata osservata in bovini con infezioni batteriche acute, come metriti o mastiti settiche.

Nei bovini, la trombocitopenia dovuta a ridotta produzione, è associata spesso ad intossicazioni da micotossine, ingestione di piante tossiche e furazolidone.

8.2.5 Forma nervosa

Le manifestazioni nervose legate a BVDV sono state rilevate in vitelli neonati in seguito ad infezione intrauterina e in adulti in cui è stato isolato un ceppo BVDV-2 (Blas-Machado *et al.*, 2004; Fusco *et al.*, 1997).

L'ipoplasia cerebellare, riscontrata frequentemente nei vitelli neonati, e le altre lesioni del sistema nervoso vengono messe in diagnosi differenziale da Scarratt *et al.* (2004) con:

- cause ereditarie dovute a geni autosomici recessivi in vacche Hereford, Shorthorn, Guernsey, Ayrshire e Holstein che determinano ipoplasia cerebellare;
- deficit di *branched chain* chetoacido decarbossilasi, che porta a una patologia definita *Maple syrup* disease per la formazione di urine dall'aspetto di sciroppo d'acero. Questo è un disordine ereditario in vacche Hereford;
- malattie da accumulo lisosomiale, in cui vi è una carenza enzimatica responsabile dell'accumulo di lipidi e proteine indigeriti all'interno di questi organelli intracellulari;
- intossicazione da organofosforici, utilizzati come insetticidi ed antielmintici. Questi, bloccando l'acetilcolinesterasi determinano un aumento della concentrazione di acetilcolina nei tessuti, amplificando, così, l'attività del sistema nervoso simpatico e parasimpatico;
- ingestione di tossine contenute in piante o funghi che infestano le piante, come la micotossina tremorgenica prodotta dal fungo endofitico *Acremonium lolii*, infestante del *Lolium perenne*, o quella prodotta dal fungo *Claviceps paspali* o, ancora, l'ingestione di alcaloidi della triptamina, contenuti nella *Phalaris*.

8.3 Diagnosi di laboratorio

8.3.1 Diagnosi indiretta

La diagnosi indiretta permette di individuare la presenza dell'infezione in una determinata zona o allevamento e consente di identificare i soggetti con infezione acuta quando si evidenzia una sieroconversione. Un aspetto particolarmente importante della

diagnosi indiretta è che essa costituisce la fase preliminare per l'individuazione dei soggetti persistentemente infetti che vengono individuati come sieronegativi. La reinfezione di un soggetto persistentemente infetto con un ceppo eterologo può però determinare una risposta anticorpale; per tale motivo la ricerca di anticorpi anti-NS3/NS2-3 risulta essere la più affidabile in quanto questa proteina, essendo altamente conservata, non stimola la risposta immunitaria del soggetto immunotollerante che si è infettato con un ceppo eterologo (Maillard e Chastant, 2000).

L'interpretazione del dato sierologico, comunque, deve essere inserito in un contesto per valutarne l'attendibilità. Quando correttamente applicati, i test sierologici possono essere usati per saggiare l'efficacia di un vaccino, valutare l'esposizione di un allevamento a BVDV e associare ai segni clinici l'infezione da BVDV (Saliki e Dubovi, 2004).

Sieroneutralizzazione

Il test della sieroneutralizzazione (SN) è stato per lungo tempo riconosciuto come il test di riferimento sierologico per BVDV. Per la sua esecuzione sono necessari dai tre ai cinque giorni. Non ci sono ceppi di riferimento universalmente accettati per la sieroneutralizzazione, ma quelli più comunemente utilizzati sono i ceppi citopatogeni NADL, Singer e Oregon C24V (Brock, 1995).

I titoli della sieroneutralizzazione possono differire da un laboratorio all'altro e tali variazioni sono dovute principalmente alla diversità antigenica dei ceppi virali isolati, ai tipi di colture cellulari usate e al numero di passaggi cui sono state sottoposte le cellule. A causa della mancanza di standardizzazione nei tests e della possibilità di ottenere risultati diversi i campioni di siero acuto e convalescente devono essere testati simultaneamente in laboratorio (Brock, 1995).

ELISA

Il test diagnostico ELISA è ampiamente utilizzato per la ricerca di anticorpi anti-BVDV perché permette di testare un numero cospicuo di campioni contemporaneamente e di ottenere il risultato in poche ore. La maggior parte dei test ELISA sono allestiti con proteina NS3 come antigene per la sua elevata conservazione.

Il test ELISA è risultato utile per evidenziare la presenza di anticorpi non solo nel siero ma anche dal latte. Niskanen *et al.*, (1991) utilizzarono per la prima volta il test ELISA su campioni di latte individuale e di massa riscontrando una correlazione tra il livello di anticorpi contro BVDV nei campioni di latte di stalla e la presenza di soggetti PI. Tale metodica è tuttora ampiamente utilizzata in quanto è un valido strumento di screening per la ricerca dell'infezione in azienda.

8.3.2 Diagnosi diretta

Isolamento virale

Nonostante gli enormi sviluppi delle tecniche diagnostiche, l'isolamento virale rimane il *Gold standard*.

Il virus cresce in molte linee cellulari, ma quelle più usate per BVDV sono le cellule dei turbinati, di testicoli e di rene bovino. Un parametro importante da considerare per la crescita in coltura cellulare di BVDV è il metodo di inoculazione. La tecnica che prevede la caduta dell'inoculo nel terreno di coltura sopra lo strato di cellule è poco sensibile, a causa del cosiddetto *effetto di colonna*: sembra che la sensibilità della metodica sia inversamente proporzionale alla distanza che la particella virale deve compiere per incontrare le cellule. Pertanto, è preferibile far adsorbire il virus direttamente sul monostrato cellulare per 1-2 ore e poi aggiungere il terreno di coltura (Saliki e Dubovi, 2004).

Il migliore campione di partenza per l'isolamento virale, nel caso di animali in vita, è rappresentato dalle cellule mononucleate del *buffy coat* ottenute dal sangue intero. Infatti, il virus si localizza soprattutto a livello intracellulare e i leucociti, rispetto al siero, non sono soggetti all'interferenza di anticorpi di origine colostrale presenti negli animali di età inferiore ai 6 mesi. Tuttavia, si possono usare come campioni di partenza anche il sangue *in toto*, il siero, tamponi da cavità nasali, dal cavo orale, dal retto, feci e seme. In quest'ultimo caso, bisogna ricordare la capacità citotossica del seme fresco, per cui esso va diluito. Nel caso di soggetti persistentemente infetti, la quantità di virus presente nell'organismo è talmente elevata che potenzialmente qualsiasi secreto, escreto o tessuto può risultare idoneo per l'isolamento di BVDV (Saliki e Dubovi, 2004).

Quando si tratta di animali morti, invece, i campioni migliori sono quelli provenienti da organi linfoidi, quali milza, placche del Peyer, linfonodi mesenterici e timo. Risulta, invece, difficile l'isolamento virale da tessuti in avanzato stato di decomposizione, quali feti abortiti, a causa del loro effetto tossico (Ciulli, 2001).

La crescita di BVDV su colture cellulari, a seconda del biotipo, può determinare o meno effetto citopatogeno. La presenza di BVDV citopatogeno si manifesta appunto con alterazione del monolayer cellulare fino alla totale distruzione.

I BVDV non citopatogeni, invece, non potendo essere distinti dalle colture cellulari di controllo, devono essere ulteriormente testati per evidenziare la presenza del virus. A questo fine si usano l'immunofluorescenza o tecniche immunoenzimatiche ELISA e l'immunoperossidasi. L'immunofluorescenza richiede l'uso di anticorpi mono o policlonali coniugati con fluoresceina isotiocianato (Brock, 1995). Tuttavia, sieri policlonali possono creare dei legami aspecifici, rendendo difficoltosa la lettura della fluorescenza e dando dei risultati falsi positivi. Al contrario, anticorpi monoclonali producono una fluorescenza molto chiara, ma bisogna assicurarsi che reagiscano contro tutti i ceppi di BVDV, in modo da non avere dei risultati falsi negativi, vista la variabilità antigenica di BVDV (Saliki e Dubovi, 2004).

L'immunoperossidasi su piastra di microtitolazione prevede, dopo un'incubazione di 4 giorni, la fissazione delle cellule sul fondo della piastra con acetone al 20%; dopodiché sono asciugate e lette dopo colorazione. Questo metodo è molto utile nel caso in cui debbano essere testati molti campioni, ad esempio per individuare i soggetti persistentemente infetti in un allevamento. Sebbene sia molto accurata per la ricerca di animali PI, questa tecnica non è abbastanza sensibile nei casi di infezione acuta di BVDV. La metodica, inoltre, non può essere applicata ai sieri di animali di età inferiore ai 3 mesi, dato che gli anticorpi materni interferiscono con la crescita di BVDV sulla coltura cellulare (Saliki e Dubovi, 2004).

Bisogna ricordare che le cellule e il siero fetale bovino utilizzati devono essere privi non solo del virus, ma anche di anticorpi verso BVDV, in quanto impedendone la crescita renderebbero vano l'isolamento.

Ricerca dell'antigene

La rapida identificazione degli antigeni virali in campioni di tessuto può essere ottenuta con metodi immunoistochimici come l'immunofluorescenza o con metodi immunoenziatici. I risultati del test immunoistochimico da biopsie cutanee sono correlati con quelli ottenuti dai test eseguiti sul sangue. La difficoltà di ottenere campioni di tessuto da animali in vita rende difficile l'applicazione di questa metodica. L'utilizzo di tecniche immunoistochimiche può rappresentare un valido strumento di diagnosi postmortem sui soggetti persistentemente infetti (Sandvik, 1999).

Poiché il sangue, invece, è facilmente ottenibile e, inoltre, è utilizzato per le ricerche sierologiche, sono stati sviluppati molti test che utilizzano il sangue come campione di partenza. Tra questi il flusso citometrico che permette di testare velocemente un largo numero di campioni e, soprattutto i tests ELISA. I test ELISA per la ricerca dell'antigene virale sono basati sull'uso di specifici anticorpi monoclonali per uno o più antigeni virali. Il rischio associato all'uso di un solo anticorpo monoclonale, è che l'epitopo riconosciuto dall'anticorpo, non sia presente nel virus isolato. Attualmente la maggior parte dei kit in commercio utilizza anticorpi monoclonali verso le proteine NS2-3 e NS3 perché sono le più conservate.

Al contrario di quanto accade con i soggetti persistentemente infetti, la probabilità di individuare antigeni virali da biopsie cutanee di soggetti vaccinati con virus vivi modificati o con infezione acuta è molto bassa (Njaa *et al.*, 2000).

Animali sperimentalmente infettati mediante inoculazione di BVDV virulento mostrano la presenza dell'antigene virale a livello cutaneo tra gli 8 e i 14 giorni post-infezione (Njaa *et al.*, 2000).

Le strutture che mostrano una maggiore recettività alla colorazione mediante la tecnica immunoistochimica sono l'epidermide e le strutture assonali, con colorazioni positive per le cellule dendritiche del derma e la cartilagine auricolare nei soggetti persistentemente infetti. Nei soggetti con infezione transitoria, invece, si rileva una maggiore presenza di antigeni virali nell'infundibolo dei bulbi piliferi e nell'epidermide nonostante sia una distribuzione multifocale (Njaa *et al.*, 2000).

La raccolta del campione, inoltre, presenta i vantaggi di una facile raccolta, senza la necessità di avere strumenti particolari e del personale specializzato, come nel caso del prelievo di sangue, in cui anche il contenimento dell'animale risulta più complesso. Il

campione, durante il trasporto in laboratorio, può essere stoccato in una soluzione di formalina, senza la necessità di refrigerazione, come avviene per i campioni di sangue.

Tecniche biomolecolari per la diagnosi di BVD-MD

L'applicazione di metodi di ricerca dell'acido nucleico presenta numerosi vantaggi rispetto all'isolamento virale per l'assenza di interferenza con anticorpi neutralizzanti, per l'elevata sensibilità e specificità e per la possibilità di evidenziare particelle virali difettive o inattivate (Brock, 1995). Tali tecniche permettono inoltre di diminuire i tempi di diagnosi e consentono di caratterizzare a livello genetico il ceppo virale isolato.

- Dot blot e ibridazione in situ

La disponibilità sempre maggiore di informazioni sulla sequenza dell'acido nucleico ha permesso lo sviluppo di sonde di ibridazione per la ricerca di BVDV. I vantaggi dell'utilizzo di questi metodi diagnostici, sono rappresentati dalla possibilità di testare più campioni contemporaneamente e dal fatto che l'RNA non necessita di essere purificato dal campione di partenza come per la RT-PCR. Tali tecniche hanno inoltre confermato la diversità delle sequenze del genoma tra i diversi ceppi di BVDV isolati riscontrata dall'analisi con anticorpi monoclonali; proprio per tali differenze genomiche sono state messe a punto diverse sonde capaci di ibridare porzioni diverse del genoma. Le sonde che permettono l'individuazione della più alta percentuale di BVDV isolati sono quelle ottenute a partire dalla regione genomica 5'UTR.

- Reverse Transcriptase-Polymerase chain reaction (RT-PCR)

Questa tecnica si basa sulla retrotrascrizione dell'RNA virale e sulla sua amplificazione ad opera dell'enzima DNA polimerasi e grazie all'utilizzo di primers che si legano specificamente a un tratto del genoma virale. A causa dell'elevata variabilità genetica dei ceppi di BVDV occorre scegliere primers in grado di amplificare la maggior parte dei ceppi isolati. Vari studi dimostrano che i primers specifici per le sequenze nucleotidiche della regione 5'UTR e del gene NS3 offrono la maggiore sensibilità.

I vantaggi dell'utilizzo di tale tecnica sono molti: essa non risente, come l'isolamento virale e l'ELISA per la ricerca dell'antigene, della presenza di anticorpi colostrali (Gilbert, 1999); può essere applicata a pool di plasma o sangue intero permettendo screening di massa; permette di ottenere buoni risultati anche da campioni non idonei per altre metodiche come, per esempio, feti abortiti in avanzato stato di autolisi, tessuti fissati in formalina e liquido seminale (Dunser *et al.*, 1999). Tale metodica rivela la presenza del virus 12-14 giorni dopo l'infezione quando inizia cioè la produzione di anticorpi neutralizzanti (Brock, 1995).

Gli svantaggi dell'utilizzo di tale tecnica sono rappresentati dal fatto che l'RNA virale deve essere estratto dal campione di partenza e dal fatto che esso è particolarmente sensibile alla degradazione per idrolisi enzimatica. Inoltre la RT-PCR è stata utilizzata fino ad oggi a scopo di ricerca e deve essere ancora standardizzata per poter essere impiegata largamente nei laboratori come metodica routinaria (Dunser *et al.*, 1999).

Si sono evolute numerose tecniche di PCR per specifiche esigenze di ricerca diagnostica.

- Multiplex PCR: vengono usate contemporaneamente più coppie di primers, in modo da amplificare due o più tratti del bersaglio. Ciò rende la reazione più specifica, inoltre, si riesce a rilevare il patogeno anche se esso è andato incontro a mutazioni in una delle regioni (Poli *et al.*, 1996). Secondo alcuni Autori, questa metodica potrebbe essere svolta senza effettuare l'estrazione dell'RNA, in quanto la sensibilità della prova rimane comunque sufficiente per identificare i portatori.

- Nested PCR: si eseguono due amplificazioni successive, utilizzando, nel secondo step, una coppia di oligonucleotidi interni rispetto ai primi usati, producendo un frammento amplificato di dimensioni inferiori, per cui possono funzionare solo se il risultato della prima amplificazione è specifico (Poli *et al.*, 1996). In uno studio effettuato per la tipizzazione dei *Pestivirus*, è stata usata la Nested PCR, consentendo di differenziare i 3 *Pestivirus* dei Ruminanti (Fulton *et al.*, 1999).

- Real-time PCR: con questa metodica, si può seguire l'accumulo del prodotto di PCR continuamente durante l'amplificazione; infatti, si impiegano diversi reagenti fluorescenti che, legando il DNA, emanano un segnale specifico. Il maggior miglioramento rispetto alla classica PCR sono l'elevata sensibilità e specificità, la quantificazione della carica virale del campione, il breve tempo di corsa e i ridotti rischi di contaminazione (Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996).

Recentemente la tecnica di real-time è stata applicata per la diagnosi di diversi virus animali tra cui il virus respiratorio sinciziale (Achenbach *et al.*, 2004), l'afta epizootica (Callahan *et al.*, 2002), il virus vescicolare suino (Reid *et al.*, 2004), alla febbre suina classica (McGoldrick *et al.*, 1998; Risatti *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2006) e al BVDV (Bhudevi e Weinstock, 2001; Letellier e Kerkhofs, 2003).

Una tecnica di real-time PCR one-step è stata recentemente messa a punto per la diagnosi del BVDV; tramite l'uso della metodica Taqman con sonde disegnate sulla regione 5'UTR è stato inoltre possibile tipizzare correttamente 54 campioni di BVDV suddividendoli in BVDV-1 e BVDV-2 (Baxi *et al.*, 2006).

CAPITOLO 9. CONTROLLO

9.1 Profilassi diretta

L'individuazione e l'eliminazione dei soggetti persistentemente infetti insieme al divieto di ingresso di nuovi portatori sono il principio fondamentale su cui si devono basare il controllo dell'infezione da BVDV e l'eradicazione della malattia.

In generale, infatti, il controllo delle malattie infettive è possibile tramite l'eliminazione dei serbatoi d'infezione, impedendo il contatto che determina la trasmissione della malattia e aumentando le resistenze degli animali ospiti dell'infezione, (Smith *et al.*, 2004).

Per esprimere tali misure preventive si fa riferimento ai concetti di biosicurezza, intesa come l'azione di prevenire l'introduzione di un agente di malattia, e di biocontenimento, che descrive l'azione di controllare un patogeno già esistente.

Una volta determinata la circolazione del virus nell'allevamento, si mettono in atto i piani di biosicurezza o biocontenimento per minimizzare gli effetti del virus o per eliminare il virus dalla mandria (Smith *et al.*, 2004). Un metodo per mettere in evidenza l'entrata o la presenza del virus in allevamento, ad esempio, è l'introduzione di animali sentinella non vaccinati, in grado di mostrare una sieroconversione del titolo anticorpale in caso di circolazione virale.

È inoltre necessario evitare la nascita di tali soggetti tramite accurati controlli delle bovine gravide. Ogni animale che viene introdotto nell'allevamento non deve essere viremico, anche se si tratta di una viremia transitoria. L'animale deve quindi essere sottoposto, durante un periodo di quarantena rigoroso e sufficientemente lungo, ad esame sierologico; nel caso in cui tale esame risulti negativo, l'animale deve essere sottoposto alla ricerca virologica. Se l'animale introdotto in azienda è una bovina gravida, il controllo al momento dell'acquisto viene raddoppiato con il controllo del prodotto del concepimento, che deve essere eseguita sia alla nascita del vitello, sia dopo i sei mesi di età con un test che evidenzi l'eventuale presenza del virus.

Il controllo dell'infezione da BVD è particolarmente importante nei centri per la fecondazione artificiale. Nei centri di produzione del seme gli animali PI rappresentano un importante fattore di rischio in quanto sono escretori del virus con lo sperma e anche perché sono in contatto con gli altri tori del centro che possono divenire quindi, a loro

volta, transitoriamente escretori del virus. La legislazione prevede, tra le condizioni sanitarie richieste per l'ammissione di un toro in un centro per l'inseminazione artificiale, una quarantena con prova di isolamento del BVDV. Due test effettuati a un intervallo di 4 settimane, permettono di differenziare i soggetti PI dagli animali infetti transitoriamente (Maillard e Chastant, 2000).

Piani di controllo e programmi di eradicazione della BVD sono stati applicati a livello nazionale nei Paesi scandinavi, Svezia, Norvegia, Finlandia e Danimarca e, a livello regionale o provinciale in altri Paesi europei tra cui anche l'Austria. I programmi di eradicazione senza l'uso di vaccini nei Paesi scandinavi sono iniziati negli anni 1993 e 1994 dando buoni risultati come dimostrato dal rapido decremento della prevalenza e dell'incidenza dell'infezione (Linberg e Alenius, 1999).

9.2 Profilassi indiretta

Il controllo indiretto dell'infezione da BVDV è volto al raggiungimento di uno stato immunitario permanente nell'allevamento, soprattutto nel gruppo dei riproduttori.

9.2.1 Vaccini

Gli obiettivi della vaccinazione sono:

- ✓ ridurre le perdite associate all'infezione, alimentando l'immunizzazione degli animali presenti all'interno dell'allevamento;
- ✓ impedire la nascita di soggetti persistentemente infetti, principale fonte di trasmissione del virus.

Un vaccino contro BVDV, per essere efficace, deve proteggere contro la viremia, in modo da evitare la disseminazione del virus e limitare l'infezione alle cellule target del sistema immunitario, impedendo l'immunosoppressione e la morte dell'animale.

Con l'immunizzazione, viene stimolata, da parte del sistema immunitario, una risposta mediata sia dai linfociti B che dai linfociti T, in quanto entrambe le risposte immunitarie sono necessarie per l'eliminazione del virus. Le gravi forme emorragiche causate da BVDV-2 in allevamenti di bovini vaccinati per BVDV-1 hanno suggerito come programmi vaccinali nei confronti di entrambi i genotipi di BVDV siano necessari

(Ridpath, 2000). Proprio per la diversità antigenica, infatti, è stato necessario allestire vaccini sia vivi attenuati che spenti che contenessero entrambi i genotipi di BVDV.

Dato che i vaccini contro BVDV dovrebbero essere in grado di proteggere contro un'ampia gamma di forme morbose, è bene valutare quale tipo di vaccino usare sulla base di diversi parametri:

✓ Risposta immunitaria indotta dal vaccino.

L'efficacia di un vaccino si basa sulla sua abilità di ridurre i segni clinici della malattia in una popolazione vaccinata rispetto ad un gruppo non vaccinato esposto allo stesso virus nelle stesse condizioni (Brock e Cortese, 2001).

Il vaccino vivo attenuato è molto vantaggioso, perché l'antigene è amplificato durante la replicazione nell'animale vaccinato, quindi è sufficiente somministrare poche dosi per immunizzare l'animale (Bolin, *et al.*, 1995).

I vaccini spenti, invece, inducono una risposta anticorpale neutralizzante più debole e un minor tempo di copertura, anche se sono più sicuri rispetto ai vaccini vivi attenuati (Bolin *et al.*, 1995).

✓ La cross-reattività.

Questa proprietà è importante nei vaccini per BVDV, data l'estrema variabilità dei ceppi circolanti nella popolazione bovina.

Sia i vaccini vivi attenuati sia quelli spenti stimolano la produzione di anticorpi in grado di cross-reagire. I vaccini vivi attenuati hanno dimostrato di indurre un livello di anticorpi coprente per 3 settimane verso 20 ceppi diversi di BVDV in uno studio (Bolin e Ridpath, 1989) e verso 10 ceppi in un altro studio (Cortese *et al.*, 1998). In entrambi i casi sono stati utilizzati ceppi appartenenti a BVDV-1 e BVDV-2 con la prova di neutralizzazione.

Prove condotte con vaccini vivi attenuati contenenti BVDV1 hanno dimostrato di cross-proteggere vitelli da infezioni sperimentali con ceppi virulenti di tipo 2 (Dean *et al.*, 1999, Fairbanks *et al.*, 2003).

✓ La protezione fetale.

L'efficacia dei vaccini di proteggere il feto dall'infezione è ancora molto discussa. Da studi sperimentali si evince una significativa, anche se non totale protezione del feto con vaccini vivi attenuati e una parziale protezione con l'uso di vaccini spenti (Cortese *et al.*, 1998).

In uno studio finalizzato a valutare l'efficacia di vaccini spenti nell'impedire l'infezione fetale, delle vacche sono state esposte all'80° e al 90° giorno di gestazione a BVDV dopo aver loro somministrato un vaccino spento prima della fecondazione; il risultato è stato che solo il 36% dei vitelli nati sono risultati protetti contro un'infezione fetale (Ellsworth *et al.*, 1993).

Invece, usando un vaccino spento seguito da un richiamo con vaccino vivo attenuato, 9 vacche sperimentalmente infettate tra il 30° e il 129° giorno di gestazione per via intranasale con una miscela di BVDV-1 e BVDV-2, per settimane, dopo la seconda vaccinazione) hanno partorito tutte vitelli sieronegativi e BVDV-free (Frey *et al.*, 2002). La vaccinazione, perciò, riduce la probabilità d'infezione fetale, ma non dà completa protezione (Van Oirschot *et al.*, 1999).

✓ La durata della copertura immunitaria.

La durata dell'immunità è un punto cardine nell'applicazione pratica dei vaccini contro BVDV, soprattutto negli allevamenti estensivi da carne, dove gli animali non sono sottoposti a frequenti controlli.

È dimostrato che i vaccini vivi modificati hanno dei vantaggi rispetto a quelli spenti determinando un maggior tempo di copertura, in quanto sono in grado di evocare una maggiore risposta anticorpale e richiedendo un numero di somministrazioni inferiori ai vaccini spenti.

La stimolazione della risposta immunitaria indotta dai vaccini attenuati è rapida e duratura, si sviluppa in circa 3 settimane dalla vaccinazione e perdura per molti mesi. In uno studio sperimentale, la risposta anticorpale neutralizzante in bovine sieronegative sottoposte a vaccino vivo modificato perdurava per 18 mesi (Cortese *et al.*, 1998), mentre vitelli di 14 giorni vaccinati con una singola somministrazione sempre con un ceppo modificato hanno mostrato una copertura verso BVDV2 a distanza di 4 mesi dalla vaccinazione (Ellis *et al.*, 2001).

Il vaccino vivo attenuato, infatti, evoca una risposta immunitaria simile a quella indotta da un virus di campo, quindi gli anticorpi nel siero possono essere rilevati per più di un anno. In qualche bovino si è visto che il titolo di anticorpi contro il BVDV cominciava a diminuire verso i 2 anni (Bolin, 1995).

✓ Immunosoppressione.

I vaccini vivi modificati presenti in commercio possono essere responsabili di una soppressione dei meccanismi di difesa immunitaria, soprattutto a carico della

componente neutrofilica e linfocitica. Secondo questi dati, è meglio evitare di vaccinare soggetti stressati con vaccini vivi attenuati. I vaccini inattivati non inducono immunodepressione (Bolin, 1995).

✓ Ripresa della virulenza.

Vaccini vivi attenuati rappresentano, anche se non di frequente, un rischio per la sicurezza, in quanto vi può essere una rivirulentazione del ceppo attenuato, con la trasmissione a soggetti sensibili presenti all'interno dell'allevamento e una viremia nel soggetto vaccinato (Fulton *et al.*, 2003).

Il riacquisto della virulenza da parte del virus attenuato avviene in seguito a ricombinazione con l'acido nucleico di origine virale e cellulare. Altre possibili e temibili conseguenze dopo la somministrazione del vaccino sono la comparsa della Malattia delle Mucose in seguito a somministrazione di un ceppo citopatogeno in animale PI. Si possono, inoltre, verificare turbe riproduttive, infatti, BVDV può passare la barriera placentare determinando morte del feto e difetti congeniti, è sconsigliato usare tale vaccino in bovine gravide (Bolin, 1995).

✓ Effetti degli anticorpi materni sulla risposta immunitaria.

Alte concentrazioni di anticorpi di origine materna specifici per BVDV possono determinare un blocco dell'induzione di una risposta protettiva verso il vaccino inattivato, che, perciò, deve essere somministrato dai 6 mesi fino al primo accoppiamento (Bolin, 1995).

Secondo altri Autori, il vaccino non viene neutralizzato né da anticorpi colostrali né da un titolo anticorpale neutralizzante pari a 1:32, comunque, l'immunizzazione può avere maggiore successo nei bovini di età compresa tra 4 e 6 mesi. Inoltre, la vaccinazione prima della monta è raccomandata per assicurare una efficacia immunizzazione (Bolin, 1995).

✓ Purezza.

La contaminazione accidentale con altri virus rappresenta un notevole rischio durante i processi di produzione di vaccini vivi modificati in laboratorio.

La maggiore fonte di contaminazione nelle colture cellulari utilizzate per l'attenuazione dei ceppi virali è il siero fetale bovino, usato per i terreni di crescita (Vicek *et al.*, 2001), tanto che si sono dovute mettere a punto delle metodiche per testare la presenza del virus all'interno del prodotto, ad esempio anticorpi monoclonali e PCR (Audet *et al.*, 2000).

Come ulteriore misura di precauzione, il siero fetale bovino può essere irradiato e trattato chimicamente (Wessman e Levings, 1999).

Produzione e somministrazione dei vaccini

- Vaccini vivi attenuati (MLV)

I vaccini vivi attenuati contengono BVDV citopatici, attenuati attraverso passaggi seriali in cellule bovine o di suino, oppure tramite mezzi chimici. Infatti, il vaccino con ceppo RT 4350 termosensibile utilizzato in Europa è stato attenuato con trattamenti con β -propiolattone. Una volta inoculato, a causa dell'elevata temperatura corporea replica esclusivamente a livello periferico e non produce viremia; per questo motivo, tale vaccino può essere utilizzato anche in bovine gravide (Bolin, 1995).

L'attenuazione altera l'attività del virus, cosicché la sua replicazione, la virulenza e l'escrezione del virus da parte dell'animale vaccinato sono ridotte. I ceppi virali comunemente utilizzati sono NADL, il ceppo Singer e il ceppo Oregon C24V.

Può essere somministrato per via sottocutanea o intramuscolo alla dose di 2 o 5 ml, sufficiente per indurre un'adeguata immunizzazione.

Può avvenire il fallimento della vaccinazione se il vaccino non è conservato in modo idoneo (Bolin, 1995).

- Vaccini inattivati

Lo scopo principale per cui si usano vaccini inattivati è quello di ovviare agli svantaggi dei vaccini vivi-modificati, sebbene questi ultimi dimostrino un'elevata efficacia (Bolin, 1995).

Per ottenere l'inattivazione del virus esistono diversi metodi: cloroformio e altri detergenti per disgregare le particelle virali e ottenere, così, un vaccino con antigene virale solubile; formalina, β -propiolattone, acetilenamine ed etilenamine solubile per ottenere un virus inattivato, ma intatto.

In questo modo, il virus perde completamente la capacità di riacquistare la virulenza o di effettuare ricombinazioni genetiche. I metodi utilizzati per l'inattivazione del virus

sono efficaci anche nei confronti di altri potenziali patogeni contaminanti il vaccino, consentendo di ridurre eventuali malattie post-vaccinali.

Sono consigliati in bovine in gravidanza, in quanto il virus inattivato non è in grado di infettare il feto.

I vaccini inattivati hanno un costo molto elevato per la loro produzione, in parte anche dovuto alla necessità di utilizzare sostanze adjuvanti e somministrazioni ripetute per conferire una prima immunizzazione. Non possono essere usati nei casi in cui è richiesta una rapida copertura anticorpale, poiché danno una risposta immunitaria molto tardiva, oltre che di breve durata (Bolin, 1995).

Possibili effetti collaterali sono una reazione infiammatoria nel sito di inoculazione, reazioni anafilattiche e, a volte, una transitoria riduzione della produzione lattea.

Sono raccomandate 2 dosi, da 2 a 10 ml, somministrate a 2-4 settimane di distanza per via sottocutanea o intramuscolare a seconda dell'eccipiente contenuto nel vaccino (Bolin, 1995).

- Vaccini per BVDV tipo II

Le gravi forme emorragiche causate dall'infezione di ceppi NCP di BVDV II hanno suscitato un nuovo interesse verso i vaccini. Sono stati raggiunti buoni risultati utilizzando vaccini attenuati con ceppi di BVDV tipo I come dimostrato dall'esperienza di Cortese *et al.*, (1998); un gruppo di vitelli vaccinati e successivamente infettati sperimentalmente con il virus, non hanno mostrato segni di malattia comparsa, invece, nei soggetti di controllo non vaccinati. Anche Dean e Leyh, (1999) hanno evidenziato l'efficacia di un vaccino per BVDV I in grado di attenuare, in animali infettati sperimentalmente, la sintomatologia riferibile al BVDV II e in grado di ridurre l'escrezione del virus per via nasale.

- Protocolli vaccinali

Il primo intervento vaccinale dovrebbe essere eseguito dai 6 agli 8 mesi di età, in modo che non si verifichi un'interferenza con gli anticorpi materni e, quindi, il fenomeno dello sbiancamento. Successivamente è effettuato un richiamo che è annuale quando si

usa il vaccino vivo attenuato, mentre i vaccini inattivati devono essere somministrati più volte durante l'anno, dato che la loro protezione è di scarsa durata (Bolin, 1995).

Per assicurare la protezione del feto durante la gravidanza, le manze devono ricevere un'iniezione di richiamo prima della prima fecondazione o monta naturale (se in precedenza l'animale è stato sottoposto a un primo intervento vaccinale) o seguire un protocollo completo di vaccinazione, di cui l'ultima somministrazione deve avere luogo al più tardi 3 settimane prima della fecondazione. Per i parti successivi, viene eseguita un'iniezione di richiamo annuale prima dell'inseminazione o della monta naturale, oppure il richiamo viene effettuato 2-6 settimane prima del parto (Maillard e Chastant, 2000).

Attualmente, in Italia sono in commercio:

- ✓ il vaccino vivo attenuato a base del ceppo Oregon C24 (Merial®) che deve essere somministrato 2 volte a distanza di 20 giorni e stimola la produzione di anticorpi neutralizzanti verso la proteina NS2-3, coprendo sia nei confronti di BVDV-1 che BVDV-2.
- ✓ Il vaccino vivo attenuato a base del ceppo termosensibile Rit 4350 (Pfizer®) che va somministrato 2 volte a distanza di 20 giorni, ma non stimola la produzione di anticorpi neutralizzanti verso la proteina NS2-3 e non copre verso BVDV-2.
- ✓ I vaccini spenti a base dei ceppi - New York e Averonite (Merial®); C86 (Intervet®); entrambi i vaccini non determinano la produzione di anticorpi verso la proteina NS2-3.

- Vaccini di nuova generazione

I migliori risultati sono stati ottenuti con vaccini a DNA codificanti per la proteina E2 (Harpin *et al.*, 1999), vaccini a subunità (Brusche *et al.*, 1999) e vaccini ricombinanti (Bolin e Ridpath, 1996).

Alcuni di questi vaccini sono in grado di evocare una buona risposta anticorpale, tuttavia risentono ancora della notevole variabilità antigenica del virus e necessitano di ulteriori studi prima di poter essere messi in commercio (Kamstrup *et al.*, 1999).

Dato che ora si è a conoscenza dell'esistenza di due genotipi di BVDV, che hanno caratteristiche antigeniche diverse, si potranno allestire vaccini contenenti entrambi i genotipi.

Sono state effettuate molte ricerche che cercano di approcciare in modo nuovo il problema dell'immunizzazione nei confronti di BVDV. Kamstrup *et al.*, hanno allestito un complesso immuno-stimolante (ISCOMs), costituito da una miscela di colesterolo, saponina e proteine. Per l'allestimento del vaccino, l'antigene viene coltivato su colture cellulari primarie di bovino, in seguito viene estratto con detergenti e, dopo essere stato purificato e concentrato, viene inserito nel complesso immuno-stimolante (Kamstrup *et al.*, 1999).

Un altro approccio per l'immunizzazione è rappresentato dagli anticorpi anti-idiotipo. Questi anticorpi reagiscono con il sito legante di un altro anticorpo comportandosi come veri e propri antigeni (Bolin, 1995).

Sono state effettuate, inoltre, prove sperimentali per verificare l'efficacia di alcuni vaccini, costituiti da una subunità multivalente della proteina E2. Per ora, però, si ottiene soltanto una parziale protezione nei confronti del ceppo omologo utilizzato nell'infezione sperimentale (Brusche *et al.*, 1999).

Il ceppo CP7-5A, mediante delezioni a carico della regione 5'UTR, ha dato origine ai ceppi mutanti d2-31 e d5-57 che, dopo 15 passaggi su coltura cellulare, mostrando stabilità da un punto di vista genetico e fenotipico, sono stati inoculati negli animali per valutare la loro efficacia come vaccini vivi. Si è notata un'attenuazione di effetti quali leucopenia e piressia, con l'induzione di un alto numero di anticorpi neutralizzanti e la copertura verso l'infezione sperimentale con il ceppo New York (Makoschey *et al.*, 2004).

I vantaggi di questi vaccini sono rappresentati da un'elevata sicurezza, ma l'applicazione pratica è vincolata da ulteriori studi che ne verifichino anche un'adeguata efficacia.

9.3 Terapia

BVDV e MD non sono curabili con trattamento specifico (Trautwein, 1991). Una terapia antibiotica può essere utile per combattere eventuali patogeni opportunisti e sovrinfezioni provocate dall'immunodepressione indotta dal virus. Si sconsiglia l'uso di corticosteroidi in caso di infezioni pnemo-enteriche tra i neonati e i vitelli, in quanto l'uso di questi farmaci può disturbare l'immunizzazione attiva verso BVDV (Trautwein, 1991).

In caso di gastroenterite acuta con notevole debilitazione dell'animale è indicata una terapia di supporto per mantenere lo stato di idratazione. È anche consigliata la somministrazione di sangue intero citrato proveniente da animali che abbiano superato la malattia o siano stati vaccinati (Farina e Scatozza, 1995). Nelle forme acute di gastroenterite con diarrea profusa si può ricorrere ad una terapia reidratante con infusione di elettroliti, può inoltre giovare la somministrazione di vitamine (Smith, 2002).

9.3.1 Terapie antivirali

Il BVDV rappresenta un modello per lo studio dell'HCV (Buckwold *et al.*, 2003), in particolare, per studi molecolari delle proteine virali (Nam *et al.*, 2001) e per la valutazione dell'attività di composti antivirali (Buckwold *et al.*, 2003).

Molte caratteristiche accomunano il virus della diarrea virale bovina al virus dell'epatite C (HCV). Tali virus, infatti, oltre ad appartenere alla stessa famiglia, i *Flaviviridae*, esprimono proteine non strutturali simili come la NS2, NS3, NS4B, NS5A e NS5B. Tali virus, inoltre, utilizzano una struttura simile per la traslazione della poliproteina virale, l'IRES, localizzata nella regione 5'UTR; tuttavia un recente lavoro ha dimostrato che l'organizzazione funzionale della 5'UTR dell'HCV e del BVDV mostrano alcune differenze nonostante la struttura dell'RNA sia simile (Grassmann *et al.*, 2005).

L'infezione da HCV causa frequentemente epatiti croniche che, spesso, progrediscono fino alla cirrosi e a carcinomi epatocellulari (Liang *et al.*, 2000); si stima che ad oggi circa 170 milioni di persone siano infettate da HCV. Purtroppo non sono stati ancora allestiti idonei sistemi di colture cellulari e i sistemi di repliconi non supportano un ciclo di replicazione virale completo; quindi i primi stadi del processo replicativo dell'HCV (attacco, entrata e vestimento del virione) o gli ultimi non possono essere oggetto di studio (assemblaggio e fuoriuscita del virione).

I protocolli terapeutici per HCV prevedono attualmente la somministrazione di interferone- α pegilato associato a ribavirina, un composto sintetico analogo della guanosina; questa terapia, però ha una efficacia limitata (60% di risposta) e causa effetti collaterali importanti.

Per tali ragioni è necessario lo sviluppo di inibitori della replicazione di HCV efficaci e selettivi.

Lo scopo principale della ricerca su composti antivirali nei confronti del BVDV, quindi, è quello di scoprire sostanze efficaci nei confronti di patologie umane correlate ad esso e, secondariamente quello di mettere a punto terapie antivirali per i *Pestivirus* animali, che potrebbero essere utilizzati soprattutto per trattare gli animali dei bioparchi, animali di valore nei programmi di fecondazione artificiale, o per eliminare *Pestivirus* contaminanti dalle colture cellulari (Givens *et al.*, 2004).

Recentemente sono stati sviluppati diversi composti che hanno attività nei confronti del BVDV: inibitori della polimerasi come il composto VP32947 (Baginski *et al.*, 2000), un tiazolo derivato dall'urea (King *et al.*, 2002) e un derivato ciclico dell'urea (Sun *et al.*, 2003); inibitori della proteasi NS3/NS4A (Bukhtiyarova *et al.*, 2002); una molecola cationica aromatica (Givens *et al.*, 2003), e un derivato acridonico (Tabarrini *et al.*, 2006), inibitori del ciclo replicativo, dei quali però non si conosce l'attività specifica; inibitori del BVDV con target gli enzimi cellulari, come inibitori dell'inosina monofosfato deidrogenasi (Markland *et al.*, 2000; Styver *et al.*, 2002) e dell' α -glucosidasi (Branza-Nichita *et al.*, 2001; Durantel *et al.*, 2001; Zitzmann *et al.*, 1999; Whitby *et al.*, 2004). Di recente è stato sintetizzato il composto BPIP, un inibitore della polimerasi di BVDV e degli altri *Pestivirus* altamente selettivo (Paeshuyse *et al.*, 2006). L'utilizzo di INF- α , inoltre, potrebbe essere un efficace trattamento terapeutico. Infatti, in seguito a trattamento con INF- α di colture cellulari di monociti di origine bovina (PBML) e di cellule muscolari di feto bovino (FBMC), la crescita sia del biotipo citopatico che non citopatico viene soppressa significativamente (Sentsui *et al.*, 1998).

SEZIONE SPERIMENTALE

1. INDAGINE SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL BVDV

1.1 MATERIALI E METODI

1.1.1 Animali e virus

Tra il 2000 e il 2006 sono stati raccolti nel territorio italiano 37 ceppi virali di BVD.

I ceppi analizzati sono stati isolati da 10 aziende dove erano stati riscontrati problemi riproduttivi, 6 situate nella provincia di Bologna, 1 nella provincia di Modena, 2 nella provincia di Vicenza e 1 nella provincia di Padova.

I virus sono stati isolati a partire da sangue e organi di soggetti PI o con MD e latte di stalla. Gli animali persistentemente infetti (PI) sono stati diagnosticati come tali grazie ad un primo screening sierologico al quale è seguita la ricerca del BVDV tramite RT-PCR sui soggetti sieronegativi, quindi, i soggetti positivi sono stati testati 2 volte a distanza di 1 mese al fine di escludere positività dovuta ad infezione transitoria.

Nelle stalle dove è stata osservata circolazione del BVDV, i vitelli nati sono stati monitorati per valutare un' eventuale infezione persistente per un periodo di 1 anno.

I soggetti con MD analizzati, erano tutti soggetti PI che mostravano i sintomi erosivi caratteristici della MD soprattutto a carico dell'apparato gastrointestinale e a livello podale.

I virus sono stati caratterizzati direttamente dall'RNA estratto senza ricorrere all'isolamento su coltura cellulare per evitare mutazioni dovute ai passaggi in vitro.

I dettagli riguardanti i campioni analizzati sono riportati in Tab. 1.1.1.1.

Nel corso dello studio sono stati inoltre analizzati ceppi virali isolati da soggetti PI presso il Laboratorio di Virologia della facoltà di Medicina Veterinaria di Berna.

Tali ceppi sono stati scelti in quanto rappresentativi dei ceppi circolanti nel territorio svizzero con lo scopo di compararli con alcuni ceppi isolati nel territorio italiano.

1.1.2 Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA virale dal plasma è stata eseguita utilizzando QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAgen, Germania) che permette di estrarre l'RNA da campioni biologici privi della componente cellulare.

L'RNA è stato estratto con TRI reagent (Sigma, USA) dalle cellule somatiche del latte (a partire da 500 mL), da 50 mg di tessuto, o da buffy coat ottenuto tramite Ficoll-PaquePlus (GE Healthcare, Sweden).

Le cellule o i tessuti sono stati omogenati con polvere di quarzo e 500 µl di TRI reagent e centrifugati a $12,000 \times g$ per 15 min. a 4°C. La fase acquosa contenente RNA è stata precipitata quindi con isopropanolo (v/v) a temperatura ambiente e centrifugata come sopra. Il pellet così ottenuto è stato asciugato e risospeso con acqua Rnase-free.

L'RNA estratto è stato conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

1.1.3 RT-PCR

Il DNA virale è stato sintetizzato tramite l'enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, USA). La reazione è stata condotta con random examers, corti segmenti nucleotidici (6-10 nucleotidi) a sequenza eterogenea che permettono l'innescio della trascrittasi inversa in molte posizioni dell'RNA, con la garanzia che esso venga retrotrascritto interamente. La scelta della metodica con random examers ci ha permesso di ottenere cDNA di tutto il genoma virale, compresa l'estremità 5'UTR che è la sequenza target della PCR.

La retrotrascrizione è stata condotta con un ciclo di incubazione a 25°C per 10 minuti, un ciclo di retrotrascrizione a 45°C per 15 minuti e una denaturazione dell'enzima Multiscribe Reverse Transcriptase a 95°C per 2 minuti.

Per la miscela di reazione della PCR è stata utilizzata la *Taq* polimerase MasterTaq (Eppendorf, Germania) ed i primers 324 e 326, che, all'interno della regione 5'UTR altamente conservata in tutti i BVDV, amplificano una sequenza di 288 nucleotidi (Vilcek *et al.*, 1994).

La reazione è stata incubata per 10 minuti a 94°C e, successivamente, è stata sottoposta a 40 cicli di amplificazione così composti: 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 56°C e 30 secondi a 72°C. La fase finale di estensione è stata prolungata per 7 minuti a 72°C.

Un amplificato di 1345 bp comprendente parte della regione 5'UTR e le regioni del genoma codificanti per le proteine N^{pro}, C e parte di E0, è stato ottenuto tramite RT-PCR utilizzando i primers 230 (5'TAGCCATGCCCTTAGTAGGACTAGC3') e 1400R (Becher *et al.*,1997) per un ceppo di ogni stalla, tra quelli isolati fino al 2003, e per i ceppi svizzeri.

La RT-PCR è stata condotta con Qiagen ONEStep RT-PCR Enzyme mix (Qiagen, Germania). Il ciclo di reazione è stato così condotto: 30 minuti a 50°C, 15 minuti a 95°C, 39 cicli a 94°C per 30 secondi, 60°C per 1 minuto, 72°C per 1 minuto, la fase di estensione finale è stata prolungata per 10 minuti.

Durante ogni reazione di RT-PCR, sono stati processati un controllo positivo e un controllo negativo. I prodotti della PCR sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% colorato con Etidio Bromuro. I risultati della corsa elettroforetica sono stati acquisiti con l'analizzatore d'immagine Fluor-S Multimager (Biorad, USA).

1.1.4 Sequenziamento e analisi filogenetica

Il prodotto di amplificazione della regione 5'UTR di 288 bp, è stato purificato con il kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Germania) e sequenziato in entrambe le direzioni con il sequenziatore automatico ABI 377 (Applied Biosystem, USA).

Gli amplificati di 1345 bp, sono stati clonati nel vettore plasmidico pCR 2.1-TOPO. Il plasmide ricombinante è stato quindi propagato e mantenuto in E.Coli ingegnerizzati coltivati in terreno selettivo per una notte a 37°C. I plasmidi contenenti il frammento di 1365 bp sono stati purificati tramite il kit Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA). Ai fini del sequenziamento dell'amplificato contenente la regione N^{pro}, è stato utilizzato il primer interno 89 (5'-

GTACATGGCACATGGAGTTGA-3') che col primer 1400 R amplifica un frammento di 1074 bp.

Le sequenze della regione 5'UTR, sono state allineate e comparate con sequenze disponibili su GenBank tramite il programma Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) del software Lasergene Biocomputing (DNASTAR Inc. Madison). L'allineamento è stato eseguito con il programma BIOEDIT ver. 5.0.9 (Hall, 1999) e l'analisi filogenetica è stata svolta usando il programma Phylip ver 3.6 (Felsenstein, 2001). La distanza filogenetica è stata calcolata con il metodo Felsenstein 84 (F84) e l'albero filogenetico è stato costruito con il metodo Neighbour-Joining.

Sequenze di 508 bp della regione N^{pro} sono state allineate e comparate a quelle di altri ceppi disponibili su Genbank con il programma PILEUP del software GCG (Winstconsin Package Version 10.2 Madison, Wisc.). L'analisi filogenetica è stata condotta con PAUPSearch in GCG e la distanza filogenetica è stata calcolata con il metodo Kimura 2-parametri; l'albero filogenetico è stato costruito con il metodo Neighbour-joining e visualizzato in Treeview.

Per valutare l'attendibilità dell'analisi filogenetica di entrambe le regioni, è stato eseguito il test di bootstrap con 1000 ripetizioni (Felsenstein, 1985).

NOME	CAMPIONI	SINTOMI	PROVINCIA	GRUPPO
1/A/00	milza	PI da stalla con problemi riproduttivi	BO	Ib
2/A/00	milza	PI da stalla con problemi riproduttivi	BO	Ib
3/A/00	milza	PI da stalla con problemi riproduttivi	BO	Ib
1/B/01	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi e 1 soggetto con MD	MO	Id
2/B/01	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi e 1 soggetto con MD	MO	Id
3/B/01	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi e 1 soggetto con MD	MO	Id
4/B/01	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi e 1 soggetto con MD	MO	Id
5/B/01	sangue	MD	MO	Id
6/B/01	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi e 1 soggetto con MD	MO	Id
7/B/01	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi e 1 soggetto con MD	MO	Id
8/B/01	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi e 1 soggetto con MD	MO	Id
1/C/01	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi	BO	Id
1/G/02	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi	BO	Ib
2/G/02	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi	BO	Ib
3/G/02	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi	BO	Ib
1/I/02	Latte di stalla	Pool da stalla con problemi riproduttivi	BO	Id
1/L/02	Latte di stalla	Pool da stalla con problemi riproduttivi	BO	If
1/M/03	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi	VI	Ib
2/M/03	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi	VI	Ib
3/M/03	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi	VI	Ib
4/M/03	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi	VI	Ib
1/N/03	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi	VI	Ia
2/N/03	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi	VI	Ia
1/O/05	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e MD	PD	Ia
2/O/05	sangue	PI from herd with reproductive failure, enterite emorragica e MD	PD	Ia
3/O/05	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e MD	PD	Ia
4/O/05	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e MD	PD	Ia
5/O/05	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e MD	PD	Ia
6/O/05	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e MD	PD	Ia
7/O/05	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e MD	PD	Ia
8/O/05	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e MD	PD	Ia
9/O/05	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e pneumonia	PD	Ia
10/O/05	Essudato pleurico	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e pneumonia	PD	Ia
11/O/05	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e pneumonia	PD	Ia
12/O/05	sangue	PI	PD	Ia
13/O/05	sangue	PI da stalla con problemi riproduttivi, sintomi respiratori e pneumonia	PD	Ia
1/P/05	sangue	MD with hemorrhagic enteritis	BO	Id

Tab. 1.1.1.1: campioni analizzati nel corso dell'indagine

1.2 RISULTATI

1.2.1 Animali

Nelle aziende analizzate sono stati ritrovati da 1 a 13 animali PI, con una percentuale media di 3.9 animali per azienda.

In 4 aziende su 8 (B, M, N e O) abbiamo riscontrato una percentuale rilevante di soggetti PI (Tab. 1.2.1.1). In tutte le stalle tranne 2 (G and O) i soggetti PI sono stati evidenziati contemporaneamente e generalmente tali soggetti avevano la stessa età.

Nella stalla G il campione 3/G/02 è stato isolato 1 anno dopo gli altri, e nella stalla O i campioni 12/O/05 e 13/O/05 sono stati isolati 2 mesi dopo l'eliminazione degli altri soggetti PI dalla stalla. Nella stalla O il gruppo dei PI era composto da animali con un'età tra 1 e 8 mesi.

Soggetti con MD erano presenti nelle aziende B, O e P. Nella stalla O, tutti gli animali, tranne 1, sono morti con una tipica forma di MD o per infezioni secondarie (pneumonia, setticemia).

<i>Azienda</i>	<i>Numero di animali per azienda</i>	<i>Data di campionamento</i>	<i>Animali PI</i>	<i>Prevalenza%</i>
A/00	160	2000	3	1.9
B/01	120	2001	8	6.6
C/01	160	2001	1	0.6
G/02	110	2002 settembre	2	1.8
		2003 marzo	1	0.9
M/03	50	2003	4	8
N/03	55	2003	2	3.6
O/05	100	2005 febbraio	11	11
		2005 maggio	2	2
P/05	60	2005	1	1.6

Tab. 1.2.1.1: Prevalenza dei soggetti PI nelle aziende analizzate.

1.2.2 Amplificazione genetica e caratterizzazione

Prodotti specifici delle amplificazioni di 288 bp e sequenze specifiche sono state ottenute per tutti i virus isolati nel territorio italiano. Comparando le nostre sequenze con ceppi di riferimento, tutti i virus da noi isolati sono stati classificati come BVDV genotipo I e non sono stati riscontrati genotipi tipo II tra i ceppi italiani analizzati.

In 7 aziende su 10 era presente più di un soggetto PI. L'identità del 100% è stato evidenziato tra i ceppi degli animali della stessa azienda in 6 stalle su 7.

Nell'azienda O, infatti, 3 di 13 ceppi hanno dimostrato una sostituzione nucleotidica. In questa azienda i ceppi sono stati isolati da animali infettati durante un lungo periodo di tempo (11-12 mesi) potendo quindi andare incontro a mutazione durante il passaggio da un animale all'altro.

L'identità nucleotidica tra i ceppi delle diverse aziende varia tra l'89,4 e il 100%. Comparando le nostre sequenze con ceppi italiani, europei e ceppi isolati in altri continenti (Fig. 1.2.2.1), abbiamo attribuito i nostri ceppi a diversi sottotipi del genotipo I e abbiamo calcolato la prevalenza dei diversi sottogruppi in Italia.

10 virus da 3 diverse aziende sono stati caratterizzati come BVDV I-b con i ceppi di riferimento NY-1, Osloss e la maggior parte dei ceppi italiani (43 su 101) precedentemente isolati (Luzzago *et al.*, 2001; Falcone *et al.*, 2003); 11 virus di 4 stalle appartengono al cluster Id con i ceppi 3/Vr/95 e 4/Vr/95 isolati da Luzzago *et al.*, (2001) in Italia e non ancora correttamente classificati.

15 ceppi da altre 2 aziende del Veneto sono stati raggruppati con i ceppi di riferimento SD-1 e NADL come BVDV Ia (Fig 1.2.2.1).

Uno dei due ceppi isolati dal latte di stalla è stato classificato come If, insieme a un ceppo austriaco e ad un altro italiano.

Nonostante in un precedente lavoro (Falcone *et al.*, 2003) il sottogruppo Ie fosse il più prevalente (26.3%), dalla nostra analisi nessun ceppo sembra appartenere a questo cluster.

Nel 40% delle stalle analizzate, il ceppo circolante appartiene al sottogruppo Id; nel 30% al sottogruppo Ib, nel 20% al sottogruppo Ia e nel 10% al sottogruppo If. Quindi i ceppi appartenenti ai sottogruppi Id e Ib sono i più rappresentati nell'area della nostra indagine.

La percentuale di identità all'interno di ciascun sottogruppo è >95.5% (Ib), >96.2% (Id) and >99% (Ia). Il ceppo If mostra un'identità del 95.8% con il ceppo italiano IT99-3690 precedentemente isolato (Falcone *et al.*, 2003).

Molti degli altri ceppi italiani sono stati confermati come Ib, Ie, Id, Ih e If come già classificati e, alcuni ceppi che non erano stati classificati sono stati raggruppati nei corrispettivi sottogruppi.

Il ceppo 2/Vr/95 che, in un lavoro precedente (Luzzago *et al.*, 2001) non era stato classificato, è stato inserito nel sottogruppo Ij insieme ai ceppi “Deer” e ceppi Africani (Baule *et al.*, 1997) e Argentini (Jones *et al.*, 2001). Tali ceppi erano stati classificati da Vilcek *et al.*, (2004) come Ij nonostante i bassi valori di bootstrap. Dalla nostra analisi risulta che tale cluster è supportato da un alto valore di bootstrap (81.3%), confermando quindi che tali ceppi formano un cluster distinto.

I ceppi 3/Vr/95 e 4/Vr/95 appartengono a Id, il ceppo 5/Vr/95 all'Ih e i ceppi 6/Bs/96, 8/Bs/97, 16/Lo/99, 17a/Cr/00, 17b/Cr/00, 18/So/00 appartengono la cluster BVDV Ie.

Considerando tutti i ceppi italiani (Luzzago *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2001; Falcone *et al.*, 2003), la percentuale dei differenti gruppi è 43.56% per Ib, 18.81% per Id, 15.84% per Ie, 14.85% per Ia, 1.98% per If, 0.99% per Ih, e 0.99% per Ij; l'1.98% dei virus isolati a livello italiano appartiene al genotipo II.

Per quanto riguarda la regione comprendente le porzioni del genoma 5'UTR, N^{pro} e E0, un amplificato specifico di 1345 bp è stato ottenuto per tutti i campioni e sequenze specifiche di 1074 bp sono state ottenute utilizzando i primers 89 e 1400R. La scelta di analizzare un solo ceppo di ciascuna stalla è stata dovuta alla identità nucleotidica evidenziata dall'analisi della regione 5'UTR.

L'analisi filogenetica di un frammento di 508 bp corrispondente alla regione N^{pro} e compreso nel frammento sequenziato, ha evidenziato che la classificazione dei ceppi italiani considerati in questa analisi, è concorde con la classificazione effettuata sulla base della regione 5'UTR. L'analisi filogenetica condotta sul frammento della regione N^{pro}, più ampio rispetto al frammento sequenziato della regione 5'UTR, è stata supportata da alti valori di bootstrap (Fig. 1.2.2.2).

Lo studio dei ceppi di origine svizzera ha inoltre dimostrato che anche in questo paese circolano diversi sottogruppi di BVDV-1 come il BVDV-1b, cui appartengono i ceppi SM05-27, LSI-1470 e S03-897; il BVDV-1e cui appartengono i ceppi S03-1175, Maria, SM0-11 e R2000-95 e il sottogruppo Ih comprendente il ceppo SM0-20.

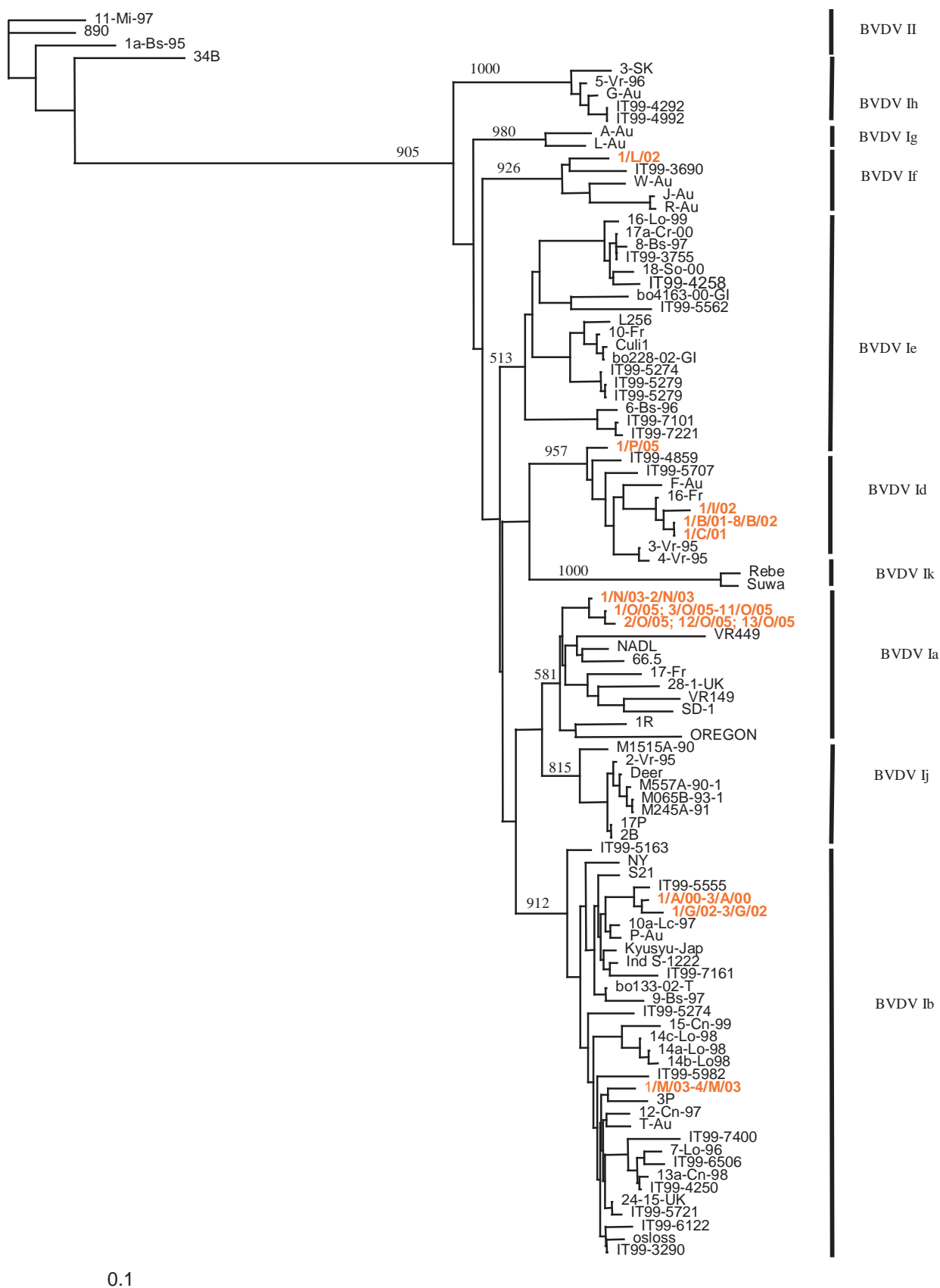


Fig. 1.2.2.1: Analisi filogenetica della regione 5'UTR dei ceppi di BVDV isolati in Italia e in altri Paesi. In rosso i ceppi isolati in questo lavoro.

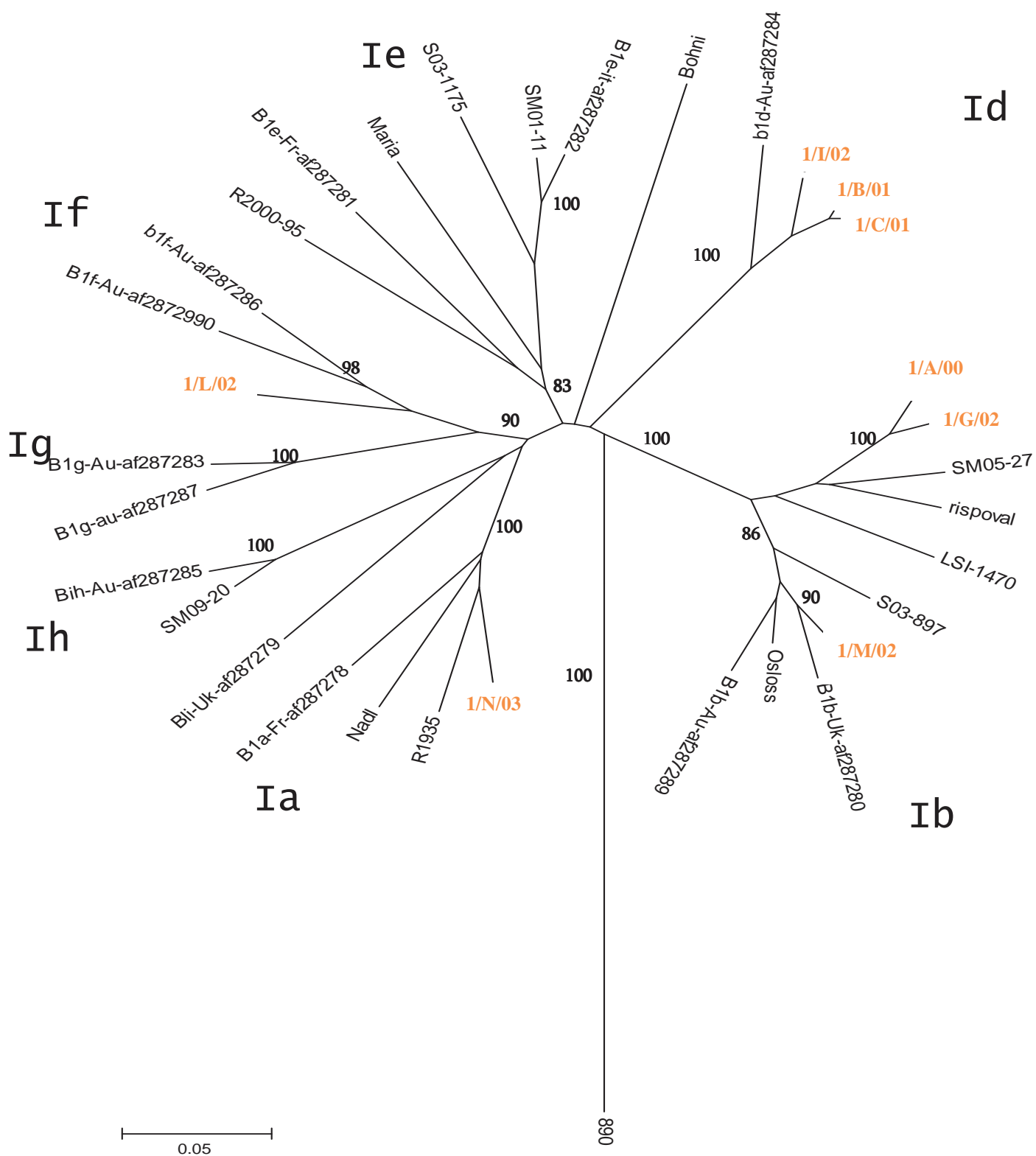


Fig. 1.2.2.2: Analisi filogenetica della regione N^{pro} . In rosso i ceppi isolati in questo lavoro

2. STUDIO SULLA VARIABILITA' GENETICA DEL BVDV

2.1 MATERIALI E METODI

2.1.1 Scelta e prelievo dei campioni

Per il nostro studio sono stati presi in considerazione 3 soggetti infetti con il virus della Diarrea Virale Bovina, indicati con la sigla di laboratorio MIPAV VIR/274-05, MIPAV VIR/365-05 e MIPAV VIR/463-05.

Il soggetto 274/05, dell'età di un mese e del peso di 46 Kg, era PI. All'esame necroscopico presentava un esteso quadro di polmonite complicata da infezioni secondarie di origine batterica, responsabile probabilmente del decesso e ulcere abomasali.

Il soggetto 365/05, all'età di 5 mesi, pesava 86 Kg. Alla visita clinica presentava debolezza, ritardo della crescita, scolo nasale, mucose arrossate, gengive congeste ed erosioni alle mucose gengivale e labiale. Inoltre erano auscultabili crepitii polmonari e rantoli e soffio tubario. Il soggetto è morto naturalmente dopo la manifestazione della sintomatologia clinica riferibile alla MD; alla necropsia presentava lesioni tipiche della MD di tipo erosivo-necrotico lungo tutto l'apparato gastro-enterico con particolare gravità a carico della cavità buccale, dell'esofago (esofagite pseudomembranosa) e del colon (colitiflite emorragica).

Il soggetto 463/05, all'età di 7 mesi pesava 138 Kg e alla visita clinica presentava rantoli e murmure vescicolare rinforzato, scolo nasale e oculare, erosioni alle mucose gengivali e labiale e diarrea profusa e sanguinolenta. Anche questo soggetto è deceduto naturalmente dopo la manifestazione della sintomatologia clinica riferibile alla MD e all'autopsia sono stati evidenziati quadri di polmonite purulenta, erosioni a livello della mucosa labiale, del palato duro e dell'abomaso, esofagite pseudomembranosa, enterite e colitiflite emorragica. Inoltre, esami ulteriori hanno permesso l'isolamento della *Pasteurella multocida* dal polmone.

Durante l'esame necroscopico svolto presso il Servizio di Prova di Patologia Generale e Anatomia Patologica sono stati prelevati campioni biologici dei tessuti con lesioni, conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo. In totale sono stati analizzati 44 organi, da ciascun animale sono stati prelevati i seguenti campioni:

- soggetto 274/05: abomaso, digiuno, rene, ovaio, cervello, cervelletto, linfonodo faringeo, linfonodo prescapolare, linfonodo mesenterico, placche del Peyer e tonsille;
- soggetto 365/05: abomaso, digiuno, cieco, rene, ovaio, cervello, cervelletto, linfonodo faringeo, linfonodo mesenterico, placche del Peyer e tonsille;
- soggetto 463/05: tessuto dalla lesione buccale, lingua, esofago, omaso, abomaso, digiuno, ileo, cieco, polmone, fegato, cuore, rene, utero, cute, cervello, cervelletto, linfonodo faringeo, linfonodo tracheale, linfonodo mediastinico, linfonodo mesenterico, milza e tonsille.

2.1.2 Estrazione dell'RNA virale, PCR della regione 5'UTR e della regione E2

Le metodiche di estrazione dell'RNA virale da tessuto, di retrotrascrizione e di amplificazione della regione 5'UTR utilizzate, sono descritte nei paragrafi 1.1.2. e 1.1.3. Per la miscela di reazione della PCR della regione E2 è stata utilizzata la *Taq polimerase MasterTaq* (Eppendorf, Germania) e i primers E2-for1 e E2-rev2 che amplificano un frammento di 596 bp all'interno della regione E2.

Il primer E2-for1 ha la sequenza: 5'- TTGGTGGCCTTA TGAGA - 3' ed è complementare alla sequenza nucleotidica in posizione 2257-2273 del ceppo di riferimento BVDV Oregon C24V (AF091605).

Il primer E2-fev2 ha la sequenza: 5' GGGCAAACCATCTGGAA -3' ed è complementare alla sequenza nucleotidica in posizione 2837-2853 del ceppo di riferimento BVDV Oregon C24V (AF091605).

La reazione è stata incubata per 10 minuti a 94°C e, successivamente, è stata sottoposta a 40 cicli di amplificazione così composti: 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 52°C e 1 minuto a 72°C. La fase finale di estensione è stata prolungata per 7 minuti a 72°C.

2.1.3 Purificazione dei prodotti della PCR

La purificazione dei prodotti derivanti dall'amplificazione è avvenuta con il kit commerciale High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Germania) seguendo il protocollo consigliato dal produttore.

2.1.4 Single-Strand Conformation Polymorphisms (SSCPs)

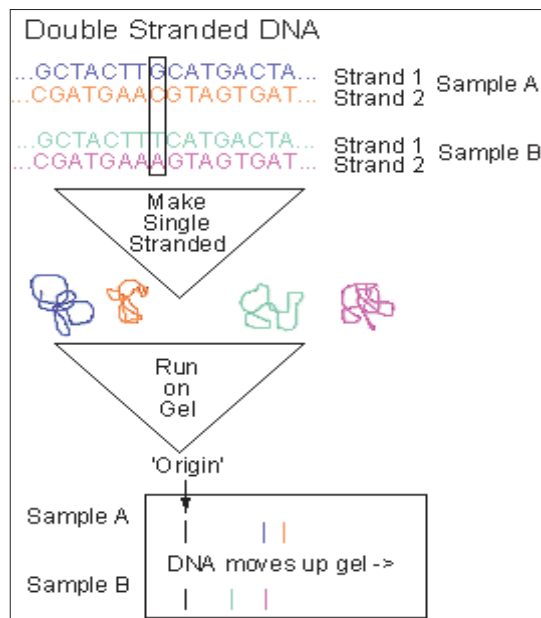


Fig. 2.1.4.1: metodica SSCP

Il metodo Single-Strand Conformation Polymorphisms (SSCPs) (Fig. 2.1.4.1) sfrutta la caratteristica del DNA a singolo filamento di acquisire in un ambiente non denaturante strutture peculiari dipendenti dalla sua sequenza nucleotidica.

Piccoli frammenti di DNA vengono denaturati e in una separazione elettroforetica su gel di poliacrilamide non denaturante questi frammenti migrano in base alla conformazione tridimensionale del filamento e non in base alla grandezza dello stesso. La conformazione tridimensionale del filamento dipende direttamente dalla sequenza nucleotidica. La sensibilità della metodica SSCP varia a seconda dell'ampiezza del frammento e permette di evidenziare, per filamenti di piccole dimensioni, anche mutazioni puntiformi costituite da una sola sostituzione nucleotidica.

La metodica prevede una denaturazione del campione a 95°C per 10 minuti, il caricamento su gel dei campioni posti in ghiaccio per evitare che i due filamenti di DNA si riappaiono prima del caricamento e la corsa elettroforetica (4 ore a 200V) in TBE Buffer 1X usando un gel di poliacrilamide TBE Gel al 20% (Invitrogen, Novex®).

2.1.5 Colorazione argantica del gel

Dopo la corsa il gel è stato colorato con l'impregnazione argantica utilizzando il kit Silverxpress Silver Stain seguendo il protocollo consigliato dal produttore (Invitrogen®, USA). In questo modo il gel è stato fissato tramite una serie di incubazioni in soluzioni specifiche preparate secondo le indicazioni fornite dal produttore.

2.1.6 Clonazione

2.1.6.1 Produzione dell'amplificato

Sulla base della variabilità evidenziata in SSCP sia nella regione 5'UTR che nella regione E2, l'amplificato del cervello del campione MIPAV VIR/463-05 è stato scelto per il clonaggio.

Partendo dal cDNA del campione precedentemente ottenuto sono state effettuate nuove PCR usando le stesse miscele di reazione viste precedentemente per la regione 5'UTR e per la regione E2 prolungando il tempo di estensione fino a 30 minuti per ottenere un'adeguata adenilazione dell'estremità 3' del DNA amplificato, essenziale per la successiva clonazione. L'amplificato è stato visualizzato su gel di agarosio al 2% e quindi purificato con l'High Pure PCR Product Purification kit (Roche, Germania).

Nel caso della regione E2 è stato necessario purificare l'amplificato dal gel a causa della presenza di prodotti aspecifici.

2.1.6.2 Produzione dei cloni

Per la clonazione è stata usata la metodica TOPO® Chemically competent Escherichia coli e come vettore per il clonaggio il pCR® 4-TOPO® VECTOR (Invitrogen, USA).

Per ogni colonia cresciuta è stata preparata una provetta contenente 3ml di brodo di coltura costituito da Lurea-Bertani +Ampicillina. Con un puntale è stata prelevata ciascuna colonia ed è stata stemperata in 10µl di H₂O sterile e poi il puntale è stato immerso nel brodo di coltura. I terreni così seminati sono stati incubati overnight a 37°C mentre l'H₂O sterile in cui è stata stemperata la colonia è stata testata in PCR seguendo rispettivamente i protocolli indicati per le regioni 5'UTR e E2.

E' stata effettuata la lettura in elettroforesi su gel di agar 2% per verificare in quali cloni si era inserito il frammento del genoma virale e i cloni positivi sono stati conservati in glicerol stock a -80°C unendo 800 μl di brodo di coltura a 200 μl di glicerolo.

Gli amplificati dei cloni risultati positivi sono stati analizzati, dopo purificazione, tramite SSCP seguendo il protocollo precedentemente descritto.

2.1.6.3 Sequenziamento e analisi delle mutazioni dei cloni della regione 5' UTR.

L'amplificato dei cloni che hanno mostrato in SSCP un pattern elettroforetico diverso sono stati sottoposti a sequenziamento al fine di identificare le differenze nucleotidiche presenti nei vari cloni. Il purificato dell'amplificato è stato sequenziato in entrambe le direzioni con il sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystem, CA). Le sequenze ottenute sono state allineate e comparate usando il programma Clustal W del software Lasargene Biocomputing (DNASTAR Inc. Madison, USA) con sequenze disponibili su GenBank. Infine, le sequenze sono state utilizzate per la predizione della struttura secondaria dell'RNA tramite il programma GeneQuest, implementato nel software DNASTar.

2.2 RISULTATI

2.2.1 Analisi della regione 5'UTR tramite SSCP

Tutti i campioni prelevati da ciascun vitello ed estratti sono risultati positivi in RT-PCR dando un amplificato specifico di 288 nucleotidi corrispondente ad un frammento della regione 5'UTR, una delle regioni più conservate del genoma del BVDV.

Nel soggetto PI 274/05 sono state evidenziate due bande uguali sia in numero che posizione in tutti gli organi dimostrando la presenza di un'unica popolazione virale. In seguito al confronto dei patterns elettroforetici, infatti, sono state evidenziate due bande, corrispondenti alla separazione dei 2 filamenti denaturati di DNA (Fig. 2.2.1.2).

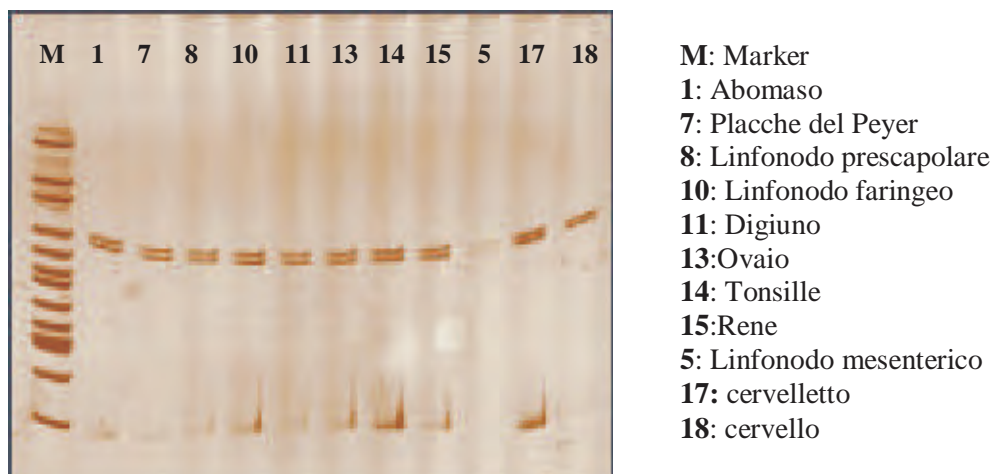


Fig. 2.2.1.2: SSCP degli organi del soggetto 274/05 della regione 5'UTR

Anche nel caso del vitello con MD 365/05 sono state evidenziate 2 bande con profili elettroforetici uguali e la presenza di una sola popolazione virale (Fig. 2.2.1.3).

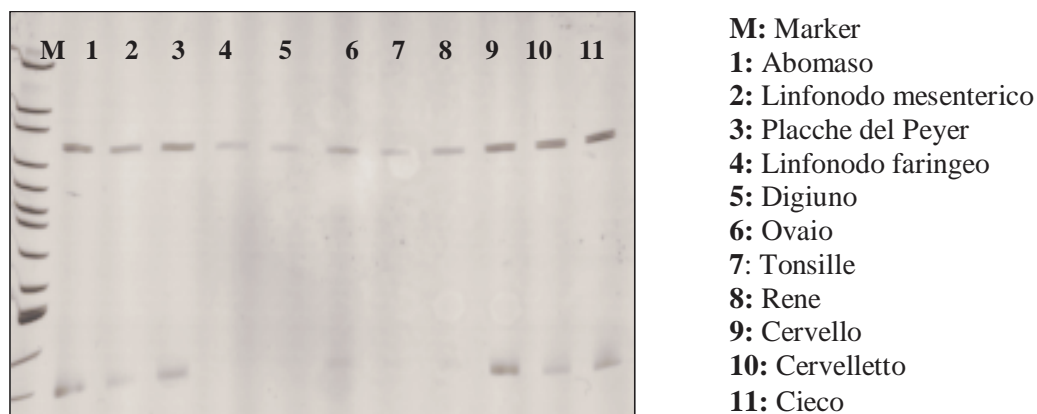


Fig. 2.2.1.3 : SSCP degli organi del soggetto 365/05 della regione 5'UTR

Nel caso del vitello 463/05, anch'esso con MD, la corsa su gel di poliacrilamide ha evidenziato patterns diversi nei vari organi. E' stata evidenziata la presenza di più di 2 bande e quindi variabilità in 8 dei 22 campioni analizzati. In particolare è stata osservata

variabilità in esofago, cute, milza, lesione buccale, lingua, abomaso, tonsille e cervello (Fig. 2.2.1.4 e 2.2.1.5).

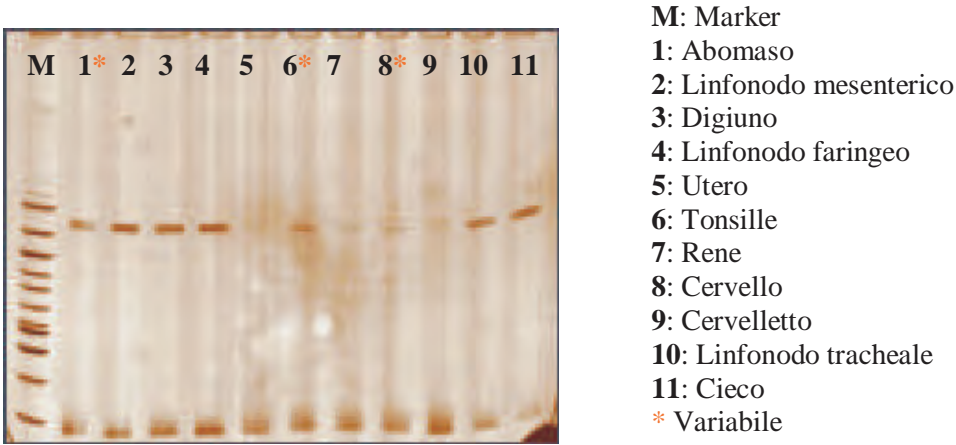


Fig. 2.2.1.4: SSCP degli organi del soggetto 463/05 della regione 5’UTR

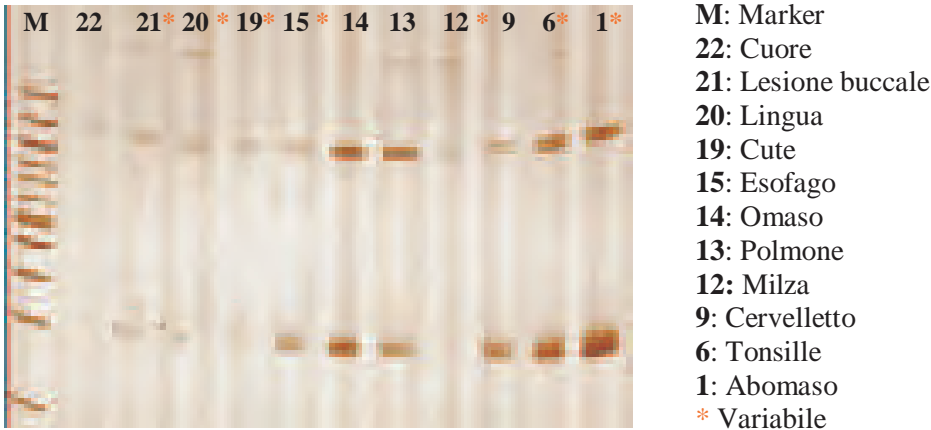


Fig. 2.2.1.5: SSCP degli organi del soggetto 463/05 della regione 5’UTR

2.2.2 Analisi della regione E2 tramite SSCP

La specificità del frammento amplificato in PCR è stata valutata con l'uso di un marker di riferimento che ha permesso di evidenziare una banda di circa 595bp corrispondente ad un frammento della regione E2 (Fig. 2.2.2.1).

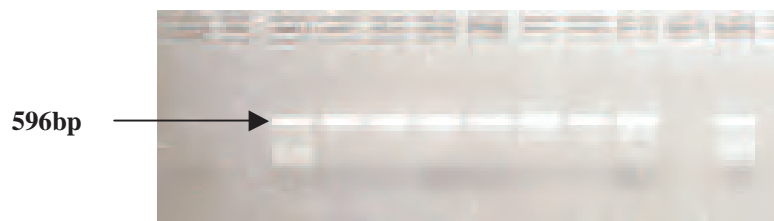


Fig. 2.2.2.1: corsa elettroforetica degli amplificati della regione E2

I prodotti di PCR purificati sono stati analizzati in SSCP che ha permesso di evidenziare i diversi patterns elettroforetici dei campioni.

Sono stati valutati alcuni organi del vitello 365/05 che nella regione 5'UTR non avevano mostrato variabilità genetica. Anche per il frammento della regione E2, non è stata rilevata nessuna differenza del profilo della corsa elettroforetica (Fig. 2.2.2.2).

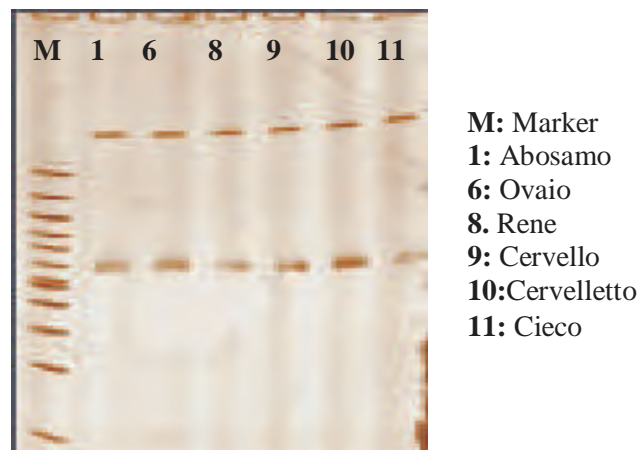


Fig. 2.2.2.2 : SSCP degli organi del soggetto 365/05 della regione E2

L'analisi si è quindi soffermata sugli organi del vitello 463/05. Sono stati, quindi, analizzati gli stessi organi presi in considerazione per la regione 5'UTR.

Sebbene alcuni organi non mostrino alcuna variabilità come digiuno, rene, fegato e ileo, in tutti gli altri campioni analizzati si sono evidenziate numerose bande con elevate differenze nel numero e nella posizione dimostrando un ampio pattern di sottopopolazioni virali (Fig. 2.2.2.3 e 2.2.2.4).



Fig. 2.2.2.3: SSCP degli organi del soggetto 463/05 della regione E2

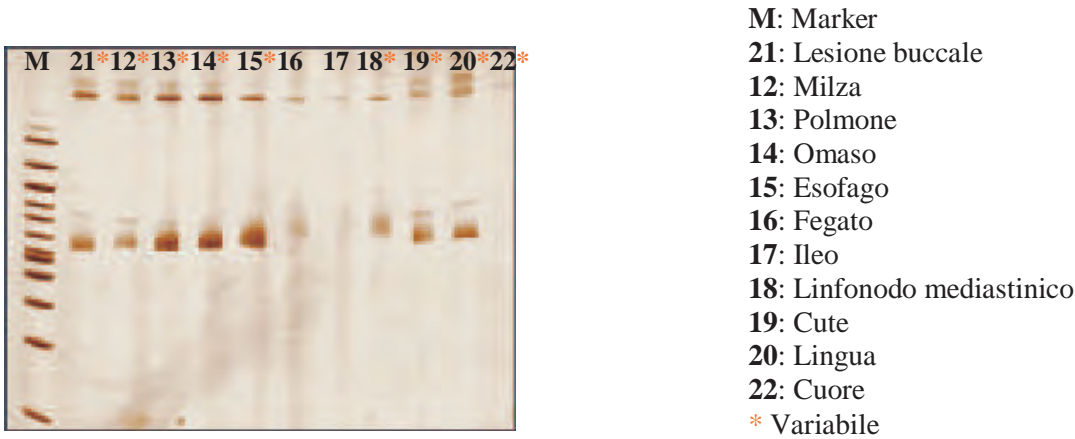


Fig. 2.2.2.4: SSCP degli organi del soggetto 463/05 della regione E2

2.2.3 Clonazione

2.2.3.1. Analisi della regione 5'UTR dei cloni

Il clonaggio del frammento 5'UTR del campione di cervello del vitello 463/05 ha permesso di ottenere 34 cloni, in 30 dei quali, tramite PCR, è stato evidenziato l'inserimento corretto del frammento della regione 5'UTR (Fig. 2.2.3.1.1).

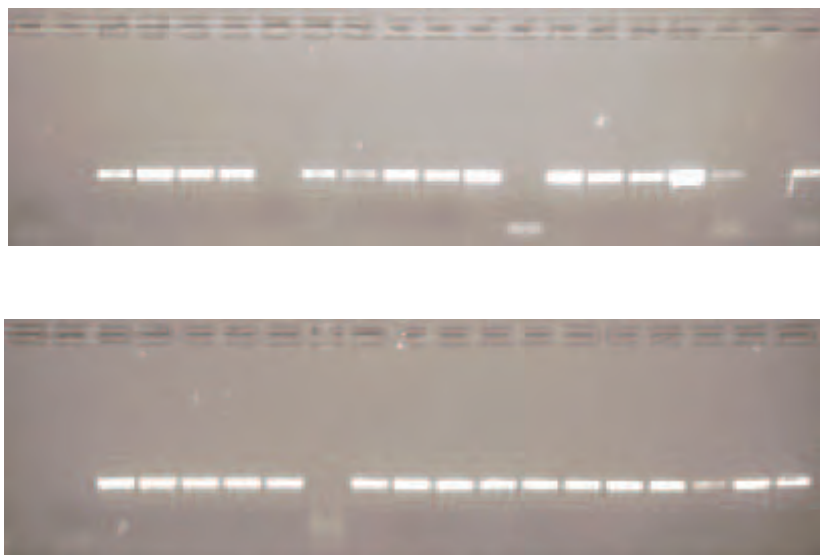


Fig. 2.2.3.1.1: corsa elettroforetica degli amplificati della regione 5'UTR dei cloni

In base alla loro corsa su gel di poliacrilamide in SSCP, i cloni mostrano tutti solo 2 bande corrispondenti alla separazione dei 2 filamenti denaturati di DNA, indicando che ogni clone è costituito da una popolazione “pura” e quindi omogenea (Fig. 2.2.3.1.3, 2.2.3.1.4 e 2.2.3.1.5).

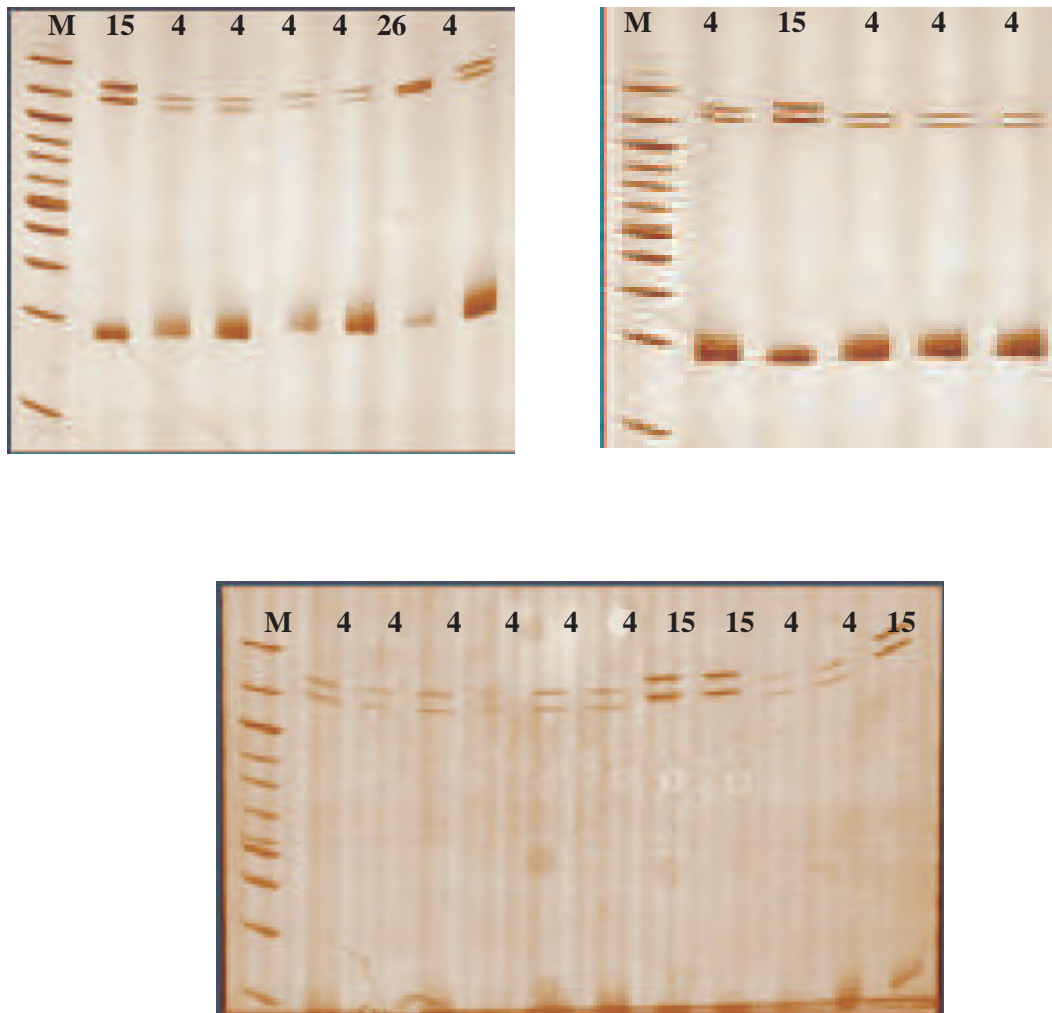


Fig. 2.2.3.1.3, 2.2.3.1.4 e 2.2.3.1.5: SSCP dei cloni della regione 5'UTR

L'analisi della posizione della banda ha permesso di differenziare 3 diversi pattern elettroforetici (tipo 4, tipo 15 e tipo 26) che si sono presentati con diversa prevalenza 78% tipo 4, 17% tipo 15 and 2.8% tipo 26.

2.2.3.2 Analisi della regione E2 dei cloni

Il clonaggio del frammento della regione E2 del campione di cervello del vitello 463/05 ha permesso di ottenere 40 cloni in cui tramite PCR è stato evidenziato l'inserimento corretto del frammento (Fig. 2.2.3.2.1).

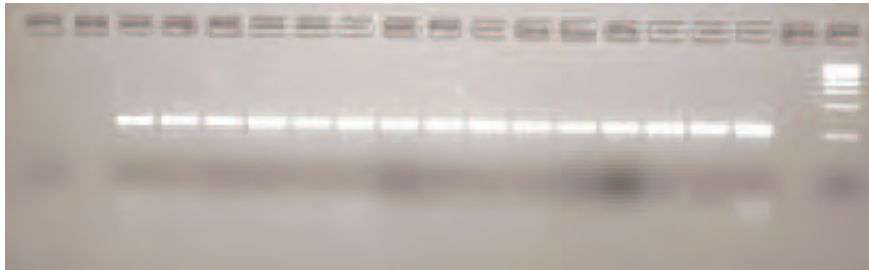


Fig. 2.2.3.2.1: Corsa elettroforetica degli amplificati della regione E2 dei cloni

In base alla loro corsa su gel di poliacrilamide in SSCP, i cloni mostrano tutti solo 2 bande corrispondenti alla separazione dei 2 filamenti denaturati di DNA, indicando che ogni clone è costituito da una popolazione “pura” e quindi omogenea. Tutti i cloni, inoltre hanno manifestato lo stesso pattern elettroforetico facendo ipotizzare la stessa sequenza nucleotidica (Fig. 2.2.3.2.2).

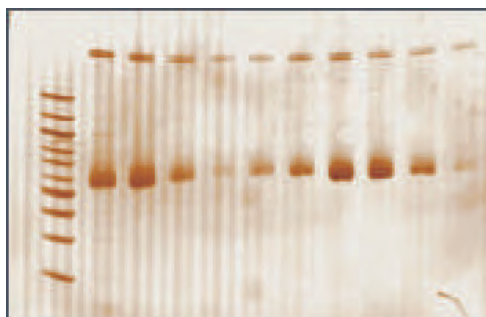


Fig. 2.2.3.2.2: SSCP dei cloni della regione E2

2.2.4 Sequenziamento della regione 5’UTR dei cloni

L’analisi delle sequenze nucleotidiche di due cloni per ogni profilo elettroforetico mostrato in SSCP, ha evidenziato che cloni con lo stesso pettern hanno sequenza uguale e che i cloni con pattern diverso differiscono per una sostituzione nucleotidica. In particolare i due cloni tipo 4 presentavano il nucleotide T e G rispettivamente in posizione 82 e 148. I cloni tipo 15 presentavano la sostituzione C in posizione 82, mentre il cone 26 presentava la sostituzione A in posizione 148 (Fig. 2.2.4.1).

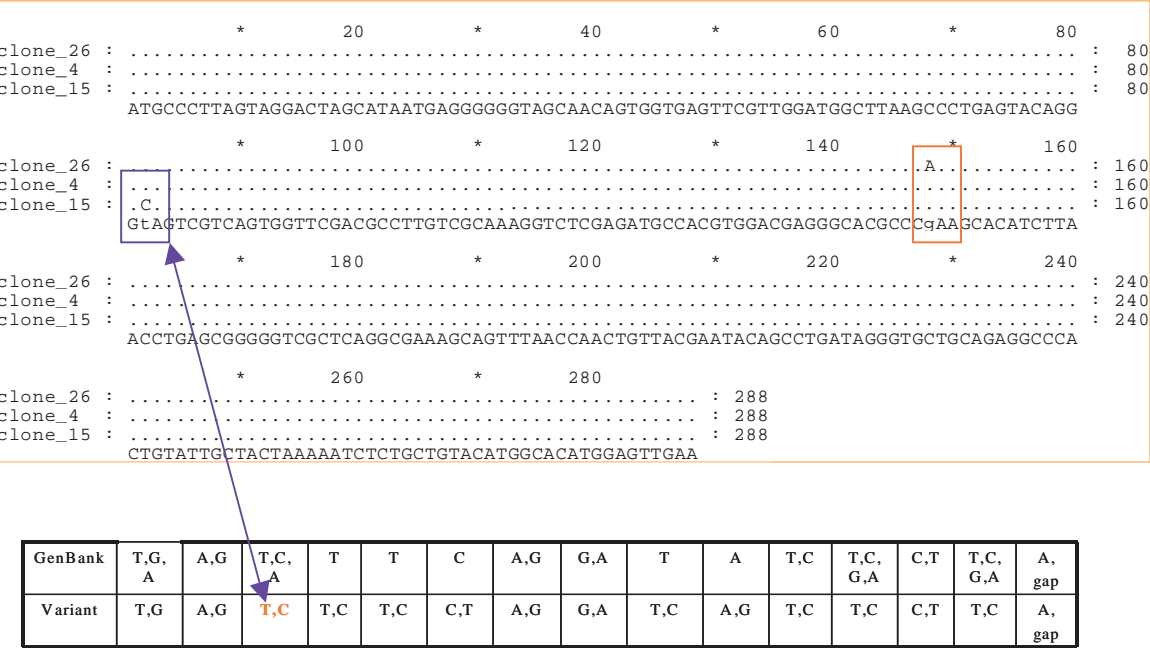


Fig. 2.2.4.1: allineamento delle sequenze dei cloni della regione 5’UTR. La Tab. indica le mutazioni precedentemente segnalate (Jones *et al.*, 2002).

In Fig. 2.2.4.2 è indicata la posizione delle sostituzioni nucleotidiche rispetto alla sequenza ed alla struttura secondaria della regione 5’UTR. La predizione della struttura secondaria delle tre sequenze ha mostrato che tale struttura resta invariata nonostante le sostituzioni nucleotidiche (Fig. 2.2.4.3).

3. Aspetti della risposta immunitaria nei confronti del BVDV

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.1 Campioni utilizzati per la quantificazione citochinica e virale in organi di soggetti PI

Per questo studio sono stati analizzati 65 campioni di tessuto dei quali 49 prelevati da 12 animali PI e 16 da 3 animali sani.

Gli animali PI, di sesso femminile, avevano un'età compresa tra 1 mese e 2 anni di vita e provenivano da allevamenti situati nelle province di Padova, Vicenza e Bologna. Questi animali sono stati diagnosticati come persistentemente infetti (PI) tramite screening sierologico risultato negativo e ricerca del BVDV.

I soggetti positivi alla ricerca del virus sono stati confermati come PI a seguito della positività alla ricerca del virus un mese dopo il primo test.

I campioni provenienti da soggetti sani sono stati prelevati in sede di macellazione da animali che non presentavano nessuna manifestazione patologica e sono risultati negativi alla ricerca del BVDV tramite PCR.

Per ciascun soggetto sono stati esaminati alcuni organi linfatici drenanti l'apparato gastro-enterico, l'apparato respiratorio e altri organi del sistema linfoide creando tre gruppi di indagine (Tab. 3.1.1.1).

Animale	Organi linfatici dell'apparato Digerente	Organi linfatici dell'apparato respiratorio	Organi del sistema linfoide
MIPAV VIR/ 560-00			Milza
MIPAV VIR /561-00			Milza
MIPAV VIR /562-00			Milza
MIPAV VIR/ 275-05	Placche Peyer Linf. Mesenterico	Linf. Faringeo Tonsilla	Linf. Precurale Milza Linf. Prescapolare
MIPAV VIR /337-05	Placche Peyer Linf. Mesenterico Linf. Omasale	Linf. Faringeo Tonsille	Linf. Precurale Linf. Prescapolare Milza
MIPAV VIR /304-05			Milza Linf. Inguinale
MIPAV VIR/ 365-05	Linf. Mesenterico Placche Peyer Linf. Omasale	Linf. Faringeo Tonsille	Milza Linf. Inguinale
MIPAV VIR /463-05	Linf. Mesenterico	Tonsille Linf. Mediastinico Linf. Tracheale Linf. Faringeo	Milza
MIPAV VIR/ 1210-05	Linf. Mesenterico	Linf. Mediastinico Linf. Retrofaringeo Tonsille	Linf. Precurale Linf. Prescapolare Milza
MIPAV VIR /1537-05	Linf. Ruminale Linf. Mesenterico	Linf. Retrofaringeo Linf. Polmonare	Linf. Aspecifici Milza
MIPAV VIR /451-02		Linf. Respiratorio Linf. Faringeo	Milza
MIPAV VIR 1746-05	Placche Peyer Linf. Mesenterico Linf. Intestinali	Tonsille	Milza Linf.Grassella
MIPAV VIR 1747-05	Linf. Intestinale Placche Peyer Linf. Mesenterico	Tonsille	Milza
MIPAV VIR 1748-05	Placche Peyer Linf. Intestinale Mesenterico	Tonsille	Milza

Tab. 3.1.1.1: campioni di organi analizzati

3.1.2 Campioni utilizzati per la valutazione della viremia e dell'espressione citochinica nei linfociti ematici di un soggetto PI

Questa indagine è stata condotta su campioni ematici prelevati da un soggetto PI con lo scopo di valutare l'andamento della viremia e l'espressione di alcune citochine.

L'animale, nato in data 27-2-05, è arrivato presso lo stabulario del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia animale il 29-4-05, proveniva da un allevamento situato in provincia di Vicenza nel quale erano stati precedentemente identificati ed eliminati numerosi PI. Tutti i soggetti PI provenienti da questo allevamento, tenuti in osservazione nei nostri tabulari, hanno manifestato una severa sintomatologia clinica che ha determinato la morte degli animali. Le lesioni riscontrate nella maggior parte di questi poteva essere ricondotta alla malattia delle mucose. Il soggetto preso in esame, invece ad eccezione di una lieve sintomatologia respiratoria osservata all'arrivo ha mantenuto un buono stato di salute durante tutto il periodo di osservazione. L'animale manifestava comunque un evidente riduzione della crescita, condizione riferibile all'infezione persistente da BVDV.

La quantificazione virale e dell'espressione citochinica è stata effettuata sui campioni prelevati a 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 mesi di età dell'animale.

L'espressione citochinica è stata inoltre quantificata in campioni ematici prelevati da soggetti sani risultati negativi alla ricerca del BVDV. Per testare questi animali è stata utilizzata la metodica di RT-PCR descritta nel paragrafo 1.1.3.

3.1.3 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto dagli organi o dal buffy coat tramite TRireagent come descritto nel paragrafo 1.1.2.

L'RNA estratto è stato trattato con DNase (10U/μl) (Amersham Bioscience, USA) al fine di rimuovere il DNA genomico che può interferire con la quantificazione dei geni cellulari.

3.1.4 Real Time PCR per la quantificazione del BVDV

La misurazione del BVDV è stata effettuata tramite la quantificazione assoluta dell'RNA virale dopo allestimento di una curva standard di riferimento.

Come regione target per la real time PCR è stata utilizzata la regione altamente conservata 5'UTR sulla quale è stata disegnata la coppia di primer qBVDVfor1 e qBVDVrev1. I primers sono stati scelti sulla base di un allineamento di sequenze effettuato con ceppi isolati in Italia (Genbank: AY451338-AY451339). La sequenza dei primers è: qBVDVfor1: 5'-AGATGCCACGTGGACGA-3' e qBVDVrev1: 5'GCACCCTATCAGGCTGT-3'.

Per l'allestimento della curva standard l'amplificato della regione 5'UTR ottenuto con i primer 324 e 326 (paragrafo 1.1.3) dal campione MIPAV VIR 463/05 è stato inserito nel plasmide pCR[®] 4-TOPO[®] VECTORE (Invitrogen, USA) e utilizzato per la clonazione come precedentemente descritto nel paragrafo 2.1.6.

Il clone 4 ottenuto è stato utilizzato per l'estrazione del plasmide con il kit rapiPure Plasmid Mini kit (QBIogene, USA) e linearizzato tramite taglio con l'enzima *BglI* (NewEngland Biolabs, UK). Infine il plasmide è stato quantificato e il numero di copie di plasmide per µl è stato calcolato con la seguente formula.

$$[(\text{quantità di plasmide}) : (\text{numero di basi del plasmide} + \text{inserto} \times 660)] \times 6.022 \times 10^{23}$$

A partire dalla soluzione plasmidica ottenuta ($1,4 \times 10^9$ copie/ µl) sono state preparate delle diluizioni in base 10 per l'allestimento della curva standard.

La Real time è stata condotta con la tecnica SYBR Green utilizzando la SYBR Premix Ex Taq (Takara, Giappone) in una miscela di reazione con volume finale di 25 µl (SYBR Premix 1X, primers 0,4 µM, Rox Dye 1X, cDNA/plasmide 2 µl).

La Real Time PCR è stata condotta con Rotor Gene 300 (Corbett Research, Australia) e sono state utilizzate le seguenti condizioni di amplificazione: 95°C per 10 minuti, 40 cicli con 95°C per 15 secondi, 52°C per 20 secondi, 72° per 30 secondi. La fluorescenza è stata acquisita alla fine di ogni fase di estensione rilevando il segnale di emissione della fluorescenza sul canale FAM (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5). Dopo l'amplificazione è stata analizzata la curva di melting dei prodotti di reazione.

Dopo la fase di messa a punto, la tecnica Real Time è stata applicata ai campioni. Ogni reazione è stata condotta con almeno 5 diluizioni plasmidiche testate in doppio e con un controllo negativo.

3.1.5 Quantificazione citochinica

I prodotti di PCR purificati per ogni citochina sono stati clonati in un plasmide, trasformati in *E. Coli* TOP 10 con Topo TA Cloning (Invitrogen, USA) e purificati con il kit rapiPure Plasmid Mini kit (QBIogene, USA).

I plasmidi ottenuti sono stati linearizzati tramite l'uso dell'enzima *Bcu I* (Fermentas, Canada) e diluiti in base 10 per tracciare la curva standard di riferimento.

I primers utilizzati per l'amplificazione delle citochine, disegnati col software *Oligo* (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA) sono descritti in Tab. 3.1.5.1.

La valutazione della risposta immunitaria è stata valutata quantificando l'espressione delle citochine IL-8 e INF- γ per i campioni di tessuto provenienti dai soggetti PI descritti in Tab. 3.1.1.1 e quantificando l'espressione delle citochine IL-8, INF- γ , IL-1 β e IL-10 per i campioni di buffy coat del soggetto PI.

Almeno 5 diluizioni sono state incluse in ogni real time PCR per calcolare le concentrazioni delle citochine.

Citochina	Primers forward	Primers reverse	Frammento (bp)
IL-8	agctggctgttgctctcttg	acctgcacaaccttctgcac	262
INF-γ	aattattcagagccaaatt	ctccagtttctcagagctgc	142
IL-1β	tgggagatggaaacatccag	tttattgactgaacgggtgc	217
IL-10	tgacagcttactgttgacc	cgcagggtcttcagcttctc	178

Tab. 3.1.5.1 : Sequenze oligonucleotidiche utilizzate per l'amplificazione dei geni delle citochine.

I parametri di ogni ciclo di amplificazione sono stati i seguenti: 10 minuti a 95°C di denaturazione iniziale seguiti da 40 cicli di 15 secondi a 95°C, 15 secondi di annealing

(IFN γ 54°C, IL-10 54°C) 20 secondi a 72°C, mentre per le altre due citochine, 20 secondi a 95°C, 20 secondi di annealing (IL-8 55°C, IL-1 β 55°C) e 30 secondi a 72°C. Il segnale di emissione della fluorescenza è stato rilevato sul canale FAM (source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5) alla fine della fase di estensione. Dopo l'amplificazione è stata analizzata la curva di melting dei prodotti di reazione.

3.1.6 Quantificazione dell'housekeeping

Al fine di normalizzare le quantità di virus e di citochine ottenute tramite Real Time PCR è stata quantificata anche l'espressione del gene housekeeper *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (GAPDH) (Leutenegger, 2000).

Il gene GAPDH è costantemente espresso da diversi tipi di cellule e in differenti situazioni, sia fisiologiche che patologiche. Per questo motivo, l'espressione di GAPDH può essere presa come valore di riferimento nell'analisi applicata a diversi campioni.

Sono stati utilizzati i seguenti primers: GAPDH BOVINO forward: 5'-GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA3' e GAPDH BOVINO reverse: 5'-CCCTCCACGATGCCAAAGT-3'. La miscela di reazione utilizzata è quella descritta nel paragrafo 3.1.3.

I parametri di ogni ciclo di amplificazione sono stati i seguenti: 10 minuti a 95°C di denaturazione iniziale seguiti da 40 cicli composti da 10 secondi a 95°C, 15 secondi di annealing a 56°C e 20 secondi a 72°C. I valori di BVDV e delle citochine ottenuti con Real Time PCR sono stati normalizzati dividendoli per i valori di GAPDH.

3.1.7 Analisi Statistica

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica per valutarne la significatività.

I livelli di espressione genica delle citochine rilevati negli organi dei soggetti PI nei tre distretti anatomici sono stati confrontati con i livelli rilevati negli organi di soggetti sani mediante test Wilcoxon per dati non parametrici.

La carica virale misurata nei tre distretti anatomici è stata confrontata con ANOVA e i valori sono stati considerati significativi per $P < 0.05$.

L'eventuale correlazione fra carica virale ed espressione di IL-8 e INF- γ negli organi dei soggetti PI è stata valutata tramite test di regressione non lineare multiparametrico.

I dati di quantificazione virale e citochinica ottenuti dal buffy coat del soggetto PI sono stati analizzati con test due way ANOVA per valutare la significatività delle variazioni temporali. Inoltre i valori del soggetto PI sono stati comparati con la media dei valori ottenuti nei soggetti sani. I valori sono stati considerati significativi per $P < 0.05$.

3.2 Risultati

3.2.1 Quantificazione del BVDV in organi di soggetti PI

Per la quantificazione assoluta del BVDV è stata allestita una real time PCR

La clonazione di un frammento della regione 5'UTR del ceppo di BVDV del campione MIPAV VIR/463-05 ha permesso di ottenere 4 cloni nei quali è stato evidenziato il corretto inserimento del frammento del genoma di BVDV (Fig.3.2.1.1) .

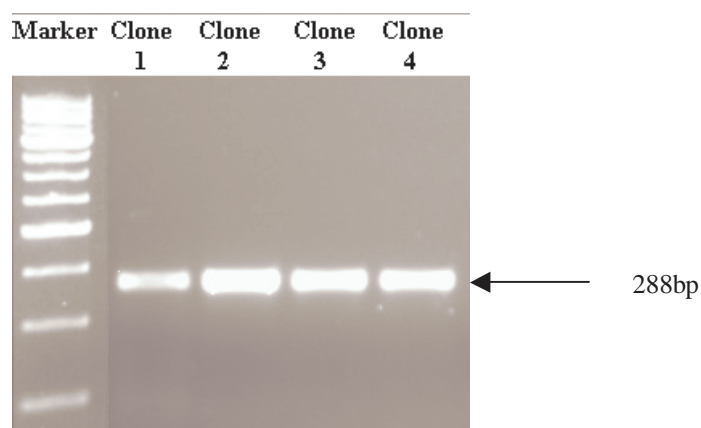
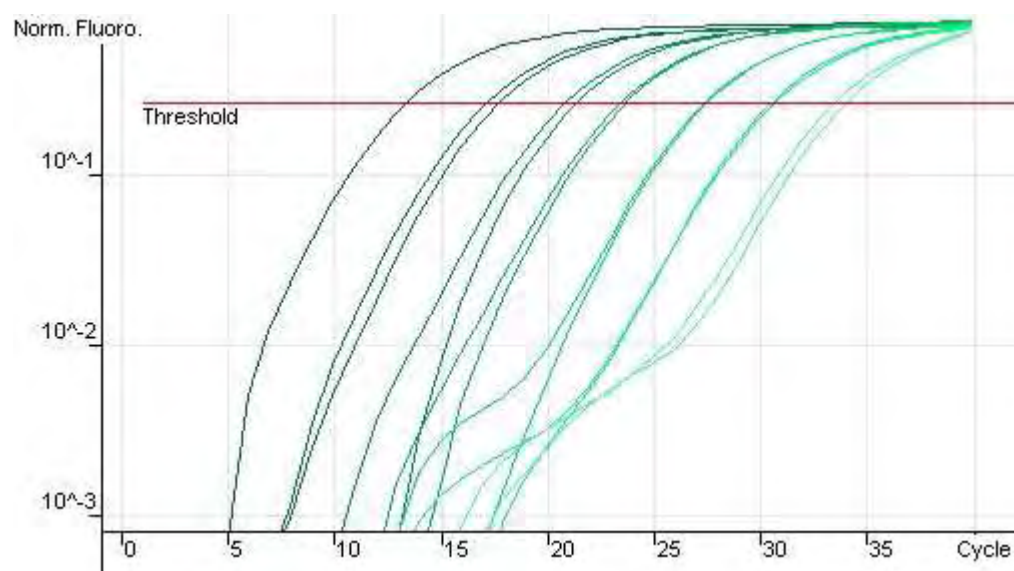


Fig. 3.2.1.1: amplificati dei cloni

Dal clone 4 è stato estratto il plasmide, e quindi linearizzato. La quantificazione ha evidenziato una concentrazione pari a 1.4×10^9 copie di plasmide/ μ l.

La linearità e l'efficienza della reazione è stata valutata sulla base delle diluizioni in base 10 del plasmide.

La linearità è stata mantenuta dalla diluizione 10^{-2} fino alla diluizione 10^{-8} con un coefficiente di correlazione (R^2) $>0,99$ indicando un elevato range dinamico. La pendenza della curva o "slope" è risultata sempre minore a -4,03 indicando una efficienza di reazione compresa fra il 70% ed il 100% (Fig. 3.2.1.2).



Standard Curve

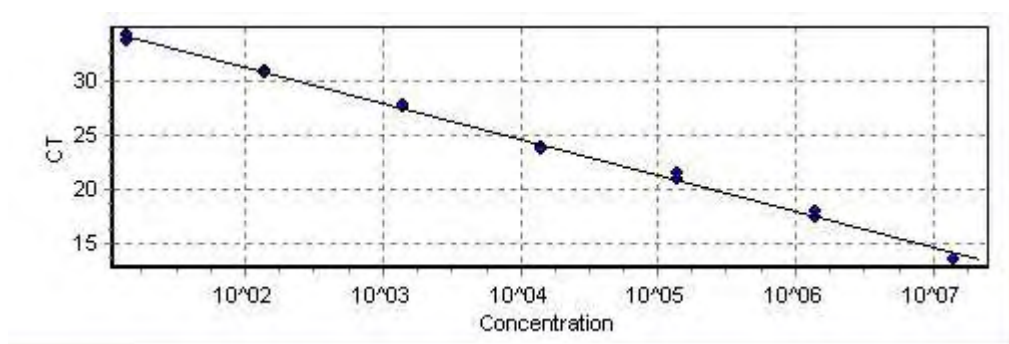


Fig. 3.2.1.2 quantificazione e curva standard ottenuta con le diluizioni dalla -2 alla -8 del plasmide

Dall'analisi della curva standard la sensibilità evidenziata per la quantificazione plasmidica è risultata di $1,4 \times 10^1$ copie.

L'analisi della curva di melting (fig. 3.1.2.3) ha mostrato la presenza di un solo picco specifico con temperatura di melting pari a 87°C indicando l'assenza di prodotti aspecifici o primers dimers.

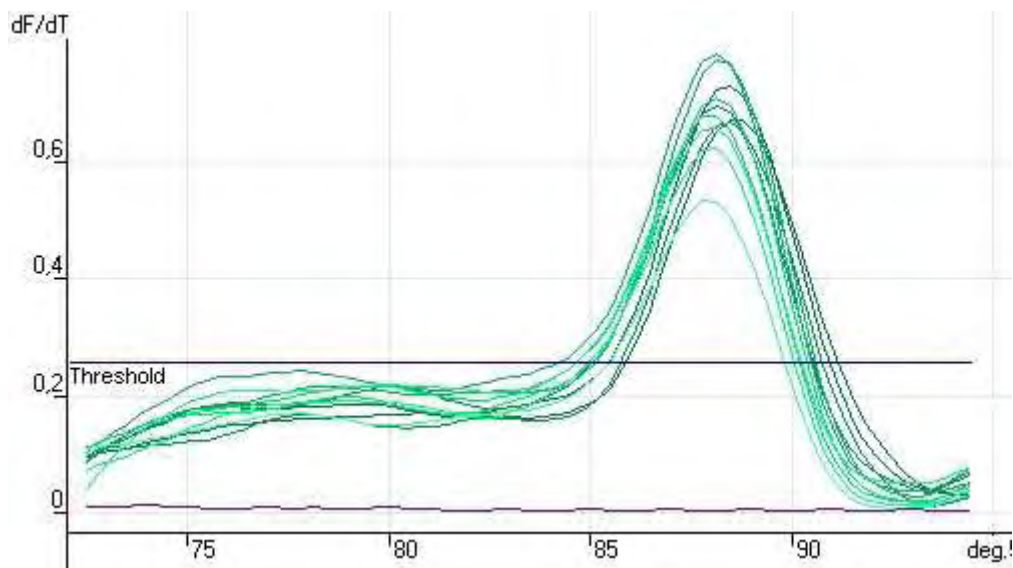


Fig. 3.1.2.3: curva di melting con picco specifico

La ripetibilità inter-assay è stata valutata calcolando il coefficiente di variabilità di 4 diluizioni plasmidiche. I valori ottenuti variavano dal 1,2% al 3,8% indicando una buona ripetibilità della prova (tab.3.1.2.1).

Concentrazione e plasmidica	Repliche	Media	DS	Log ₁₀ media	Log ₁₀ DS	CV%
10^5	5	$3,3 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^4$	5,5	0,064	1,16
10^3	5	$2,8 \cdot 10^3$	$4,2 \cdot 10^2$	3,4	0,066	1,93
10^2	5	$2,5 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^1$	2,4	0,062	2,58
10^1	5	$3,3 \cdot 10^1$	$4,1 \cdot 10$	1,6	0,057	3,80

Tab. 3.1.2.1: nella tabella sono riportati i valori di media, deviazione standard e coefficiente di variabilità (CV) ottenuti nella prova di Real Time PCR.

La quantificazione dell'RNA virale dei soggetti PI nei soggetti PI e sani è stata valutata tramite real time PCR con la metodica Sybr Green.

In figura 3.2.1.1 è riportata la carica virale degli organi linfatici drenanti l'apparato respiratorio, digerente e negli altri organi linfoidi. I valori più elevati di BVDV sono stati registrati negli organi linfatici drenanti l'apparato respiratorio ed i più bassi nell'apparato digerente, anche se tali differenze non sono supportate da significatività statistica.

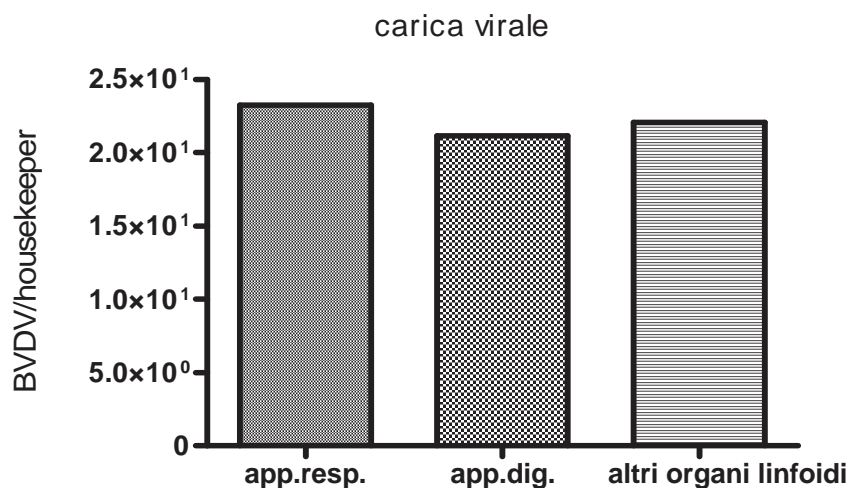


Fig. 3.2.1.1: quantificazione di BVDV nei distretti anatomici considerati

3.2.2 Quantificazione citochinica in organi di soggetti PI

L'espressione delle citochine IL-8 e INF- γ è stata quantificata tramite real time PCR.

I risultati della quantificazione dell'espressione genica delle due citochine sono riportati nelle figure 3.2.1.2, 3.2.1.3 e 3.2.1.4.

In ciascun distretto anatomico considerato (organi linfatici dell'apparato respiratorio, digerente e altri organi linfoidi), per entrambe le citochine è evidente una differente espressione fra animali PI ed animali sani. In particolare è apprezzabile una down-regulation delle due citochine nel gruppo PI che, nel caso di INF- γ assume significatività statistica ($P=0,001$).

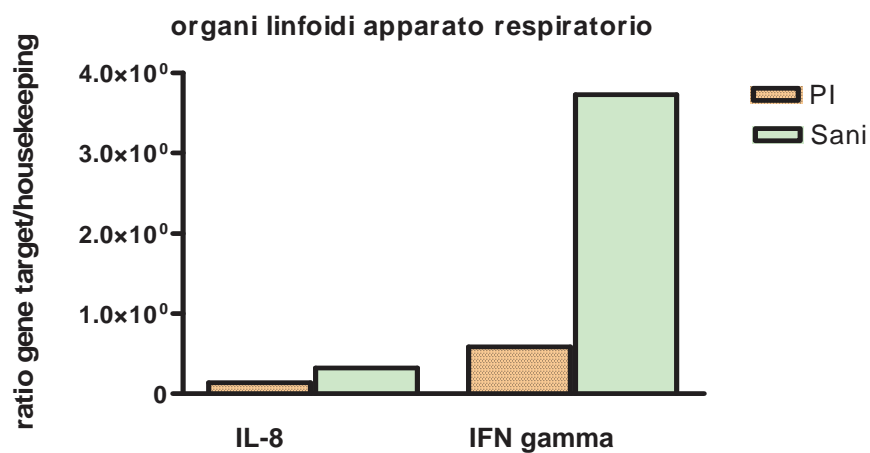


Fig. 3.2.1.2: espressione di IL-8 e INF- γ negli organi linfoidi dell'apparato respiratorio

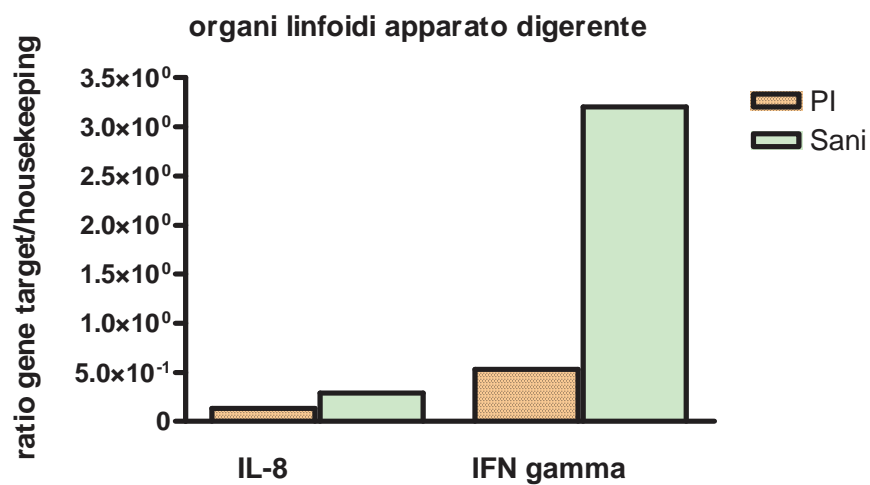


Fig. 3.2.1.3: espressione di IL-8 e INF- γ negli organi linfoidi dell'apparato digerente

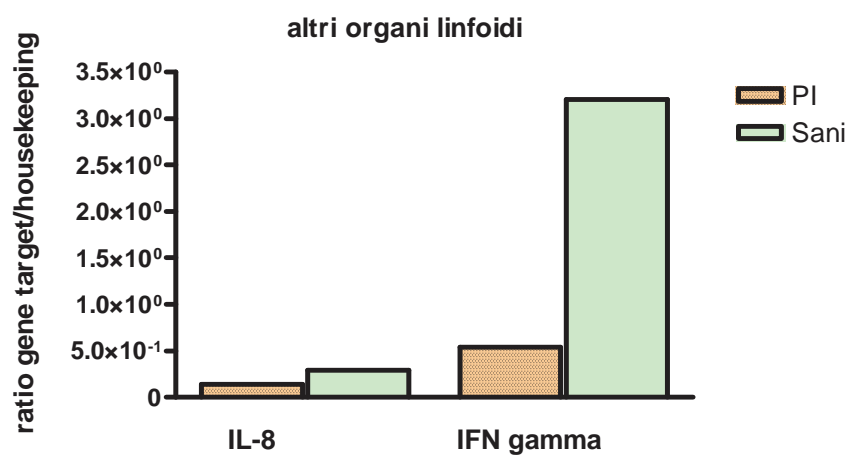


Fig. 3.2.1.4: espressione di IL-8 e INF- γ negli altri organi linfoidi

La relazione fra carica virale ed espressione delle due citochine, valutata tramite test di regressione non lineare multiparametrico ha evidenziato una correlazione fra i 3 parametri esprimibile attraverso la seguente formula matematica:

$$\frac{4806,18 \times \text{IL-8} \times \text{INF-}\gamma}{1 + 132,8 \times \text{IL-8} - 97,6 \times \text{INF-}\gamma}$$

Tale espressione matematica, rappresentata dal grafico tridimensionale (Fig. 3.2.1.5), ha mostrato una correlazione statistica, effettuata tramite test di regressione non lineare multiparametrico, di notevole valore biologico ottenendo un coefficiente di correlazione (R^2) pari a 0,6.

Ciò indica come il 60% della variazione nell'espressione dei due geni target di IL-8 e INF- γ sia imputabile ad una diversa carica virale all'interno dell'organo linfatico considerato.

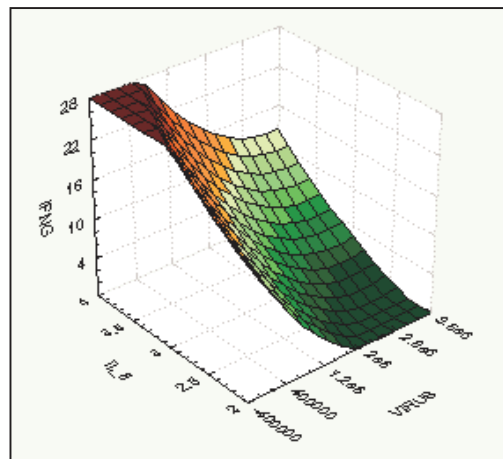


Fig. 3.2.1.5: Rappresentazione tridimensionale della funzione matematica illustrata sopra.

3.2.3 Quantificazione del BVDV e delle citochine nel buffy coat di un soggetto PI

La quantificazione dell'RNA virale e delle citochine INF- γ , IL-1 β , IL-8 e IL-10 è stata valutata tramite real time PCR con metodica Sybr Green a 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 mesi di età dell'animale.

L'andamento della carica virale del soggetto PI durante il periodo di monitoraggio, è rappresentato nella figura 3.2.3.1.

L'analisi statistica ha dimostrato che la viremia in tale soggetto subisce nel corso del tempo delle variazioni statisticamente significative (Tab. 3.2.3.1).

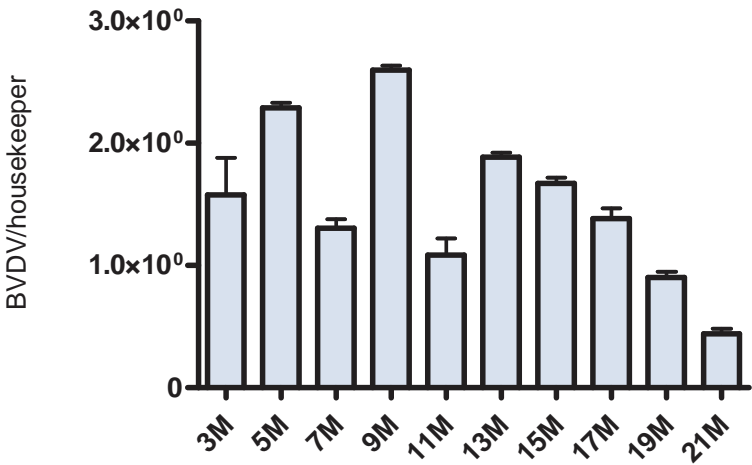


Figura 3.2.3.2: viremia del soggetto PI durante il periodo di monitoraggio

	3M	5M	7M	9M	11M	13M	15M	17M	19M	21M
3M		+		+					+	+
5M			+		+		+	+	+	+
7M				+		+				+
9M					+		+	+	+	+
11M						+	+			+
13M									+	+
15M									+	+
17M										+

Tab. 3.2.3.2: variazioni statisticamente significative della viremia (+) tra i diversi tempi di monitoraggio

I risultati della quantificazione delle diverse citochine ottenuti dal buffy coat del soggetto PI sono stati comparati con la media dei valori delle citochine ottenuti nei soggetti sani.

Per quanto riguarda l'INF- γ non è stata rilevata espressione di tale citochina nella maggior parte dei tempi di campionamento dell'INF- γ , mentre la sua espressione è stata evidenziata al mese 15, 17 e 19 (Fig. 3.2.3.3).

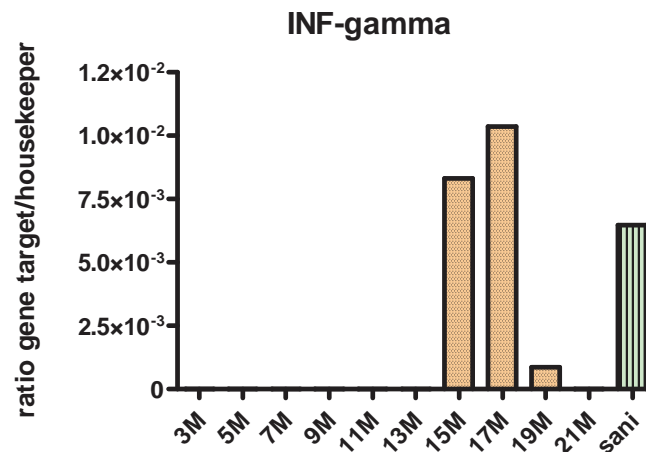


Fig. 3.2.3.3: andamento temporale dell'espressione di INF- γ

È stato possibile rilevare l'IL-1 β in 6 su 10 tempi di campionamento, e in particolare nei tempi 5, 7, 9, 11, 13 e 21.

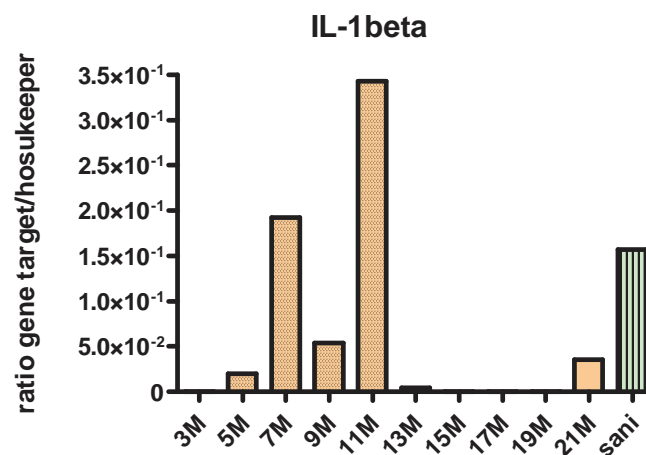


Fig. 3.2.3.3: andamento temporale dell'espressione di IL-1 β

L'espressione dell'IL-8 è stata evidenziata e quantificata in tutti i prelievi effettuati; l'andamento dell'espressione di tale citochina risulta crescente da 9° fino al 19° mese di vita dell'animale dove raggiunge un picco di espressione.

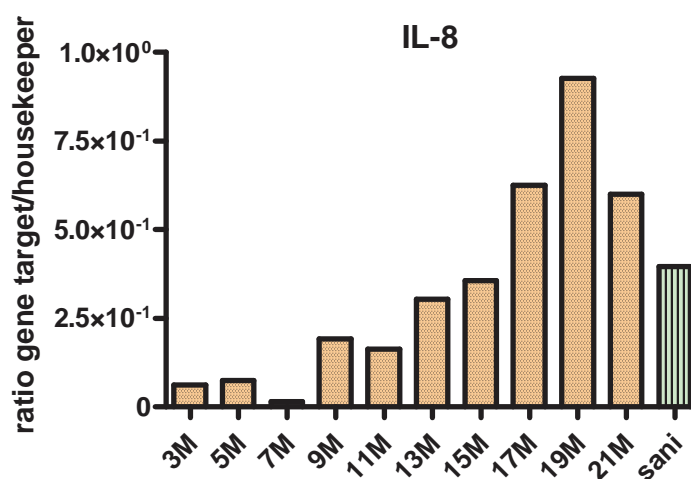


Fig. 3.2.3.3: andamento temporale dell'espressione di IL-8

Per quanto riguarda l'IL-10, è stato possibile effettuare una quantificazione solo al 13° e al 15° mese di vita dell'animale.

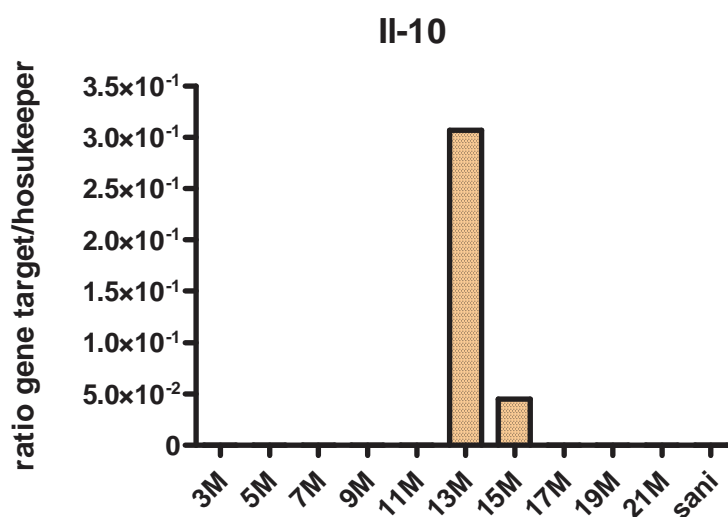


Fig. 3.2.3.3: andamento temporale dell'espressione di IL-10

A differenza di quanto osservato a livello degli organi linfoidei non è stata evidenziata differenza statisticamente significativa fra l'espressione citochinica dei soggetti sani e quella del soggetto PI a livello dei linfociti ematici.

L'analisi statistica ha inoltre evidenziato che non c'è correlazione fra l'espressione delle singole citochine e la quantità di BVDV presente a livello dei linfociti.

4. DISCUSSIONE

La BVD-MD è una malattia conosciuta ormai da 60 anni, la prima segnalazione risale agli anni '40, e oggi è ampiamente diffusa in tutti i Paesi dove è presente l'allevamento bovino; in mancanza di adeguati piani di controllo la BVD-MD diventa endemica, inducendo all'interno della popolazione bovina prevalenze di soggetti sieropositivi dell'60-85% e livelli di PI che generalmente non superano l'1-2% (Houe *et al.*, 1999). Per contro nei Paesi in cui sono stati effettuati efficaci piani di controllo (Svezia, Norvegia e Danimarca) anche su base volontaria, la prevalenza della BVD si è abbassata sensibilmente. Il piano di controllo attuato in Svezia a partire dal 1993 ha portato in 11 anni ad un abbassamento della prevalenza degli allevamenti infetti dal 40% allo 0,9% (Hult e Lindberg, 2005).

La presenza dell'infezione da BVDV nel territorio italiano è ormai risaputa e di notevole entità e causa importanti perdite economiche dovute soprattutto alla riduzione della produzione di latte, riduzione della fertilità, aborti e problemi respiratori che diminuiscono notevolmente la performance dell'allevamento.

Ad eccezione di alcune regioni il controllo della BVDV in Italia è attualmente basato sull'iniziativa privata dei singoli allevatori che, scontrandosi con le perdite economiche legate a questa malattia intraprendono azioni di contenimento dell'infezione e risanamento dell'allevamento sia tramite profilassi diretta che indiretta.

Nell'ambito di queste iniziative di controllo, i punti cardine sono rappresentati dall'identificazione dei soggetti persistentemente infetti (PI) e dal controllo delle reinfezioni tramite profilassi diretta e indiretta. Al fine della profilassi diretta diventa rilevante la conoscenza della situazione locale, anche grazie alla possibilità di sfruttare le recenti acquisizioni di epidemiologia molecolare.

Lo studio della situazione locale del BVDV da noi condotto ha permesso di evidenziare la presenza di un numero molto elevato di PI in 4 delle 8 aziende analizzate a differenza di quanto riportato in letteratura. La prevalenza di soggetti PI all'interno dell'allevamento generalmente non supera il 2% (Houe, 2003).

A nostro avviso la comparsa di un elevato numero di soggetti PI in una azienda può essere riconducibile principalmente a due cause: in aziende con soggetti della stessa età la sincronizzazione dei calori crea la contemporanea presenza di un elevato numero di bovine gravide sensibili alla generazione di soggetti PI. Invece, la presenza di più

soggetti PI di età diverse sembra essere causato da una non corretta gestione sanitaria dell'allevamento, soprattutto la mancanza di una separazione tra i nuovi nati e le vacche gravide.

Diversi Autori (Vilcek *et al.*, 1999a; Nagai *et al.*, 2004) hanno messo in evidenza l'importanza dell'analisi filogenetica per lo studio dell'evoluzione e dell'epidemiologia dei virus e per tracciare l'origine di nuovi focolai.

Gli effetti della variabilità genetica del BVDV sulla diagnosi e sul controllo della malattia sono ben conosciuti (Fulton *et al.*, 2003; König *et al.*, 2003; Bolin and Grooms, 2004) e molte ricerche hanno lo scopo di aumentare la conoscenza riguardo ai genotipi e alla distribuzione dei diversi sottogruppi nelle differenti aree geografiche (Parks *et al.*, 2004; Tajima *et al.*, 2005).

Nel nostro studio sono stati analizzati dal punto di vista genetico 37 ceppi virali provenienti da 10 aziende situate in Emilia Romagna e Veneto.

Una alta omologia è stata rilevata tra i virus circolanti in ciascun allevamento. La selezione di un ceppo all'interno dell'azienda è stata evidenziata in lavori precedenti (Paton *et al.*, 1995b) ed è una caratteristica dell'infezione da BVDV dovuta al fenomeno dell'immunotolleranza. I ceppi virali, infatti, si selezionano in base ai ceppi che infettano i soggetti immunotolleranti mentre le varianti virali rappresentano uno "svantaggio" per il virus in quanto innescano nei soggetti immunotolleranti e nei soggetti immunocompetenti una risposta immunitaria che porta all'eliminazione del virus dopo un'infezione transitoria.

L'analisi genetica ha messo in evidenza che all'interno del territorio preso in esame, non circolano ceppi virali di BVDV II, anche se tale specie è stata riscontrata in due focolai in aree diverse del nord Italia (Luzzago *et al.*, 2001).

Due lavori precedenti hanno permesso la caratterizzazione di ceppi di BVDV italiani; in nessuno dei due è stato messo in evidenza la presenza del sottogruppo Ia (Luzzago *et al.*, 2001; Falcone *et al.*, 2003) e in tali lavori alcuni ceppi virali sono rimasti non classificati.

Nella nostra indagine, l'analisi filogenetica ha permesso l'attribuzione a specifici sottogruppi di tutti i ceppi virali, dimostrando non solo la presenza di ceppi di BVDV Ia ma anche di Ij, ceppi che non erano ancora stati evidenziati sul territorio italiano.

Nonostante alcuni lavori abbiano dimostrato una correlazione tra sottogruppi infettanti e sintomatologia clinica (Evermann e Ridpath, 2002; Fulton *et al.*, 2002), la nostra indagine non ha evidenziato tale correlazione.

In uno dei due focolai determinati da virus del sottogruppo BVDV Ia è stata osservata sintomatologia acuta e morte di tutti i soggetti tranne 1; 8 dei soggetti hanno mostrato la sintomatologia della MD con lesioni orali ed enterite emorragica e 4 invece sono deceduti in seguito a polmonite e setticemia dovuta a infezioni secondarie. Questo quadro e l'evoluzione del focolaio, potrebbe essere stato favorito dal cattivo management e, soprattutto, dal fatto che i soggetti PI, dopo che erano stati diagnosticati come tali, non sono stati separati dagli altri. Dopo la comparsa dei primi sintomi di MD, infatti, la sintomatologia si è manifestata velocemente anche negli altri soggetti e la morte di tutti gli animali è avvenuta in 3-5 giorni.

Riguardo alla distribuzione geografica, tutti i ceppi Ia e Ib sono stati isolati in Veneto; inoltre, da tale regione, provengono anche i ceppi Ij, Id e Ih precedentemente isolati da Luzzago *et al.*, (2001) mostrando quindi una maggiore eterogenicità rispetto ai ceppi circolanti in Emilia-Romagna e Lombardia,

BVDV Ib è il ceppo con maggior prevalenza in Italia, ma, nel nostro studio la prevalenza totale degli altri ceppi (72,9%) è risultata maggiore rispetto alla prevalenza del BVDV Ib (27,02%). Sono stati evidenziati, infatti, gruppi come Ia e Ij che non erano mai stati isolati fino ad oggi in Italia e che circolano maggiormente in paesi extra europei. Lo studio comparativo delle regioni 5'UTR e N^{pro} ha permesso una più approfondita analisi dei ceppi isolati. La classificazione dei ceppi ottenuta sulla base della regione N^{pro} ha confermato quella ottenuta sulla base della regione 5'UTR, inoltre l'analisi filogenetica condotta sulla regione N^{pro} è stata supportata da più alti valori di bootstrap, confermando la validità dell'utilizzo di questa regione ai fini dell'analisi filogenetica.

Lo studio sulla variabilità genetica di BVDV nelle regioni del genoma virale 5'UTR e E2 di alcuni ceppi da noi analizzati in soggetti malati, è stato condotto applicando la tecnica SSCP agli organi di 2 soggetti con MD e un soggetto PI. Tale tecnica ha permesso di evidenziare variabilità genetica in uno dei due soggetti con MD; variabilità genetica non è stata invece osservata nell'altro soggetto con MD ed in un soggetto persistentemente infetto che non mostrava sintomatologia riferibile alla MD.

La presenza di maggiore variabilità in un soggetto con MD potrebbe essere correlabile ad una maggiore attività proliferativa del virus che induce la comparsa di più varianti virali, anche se non è stata ancora studiata la correlazione fra la presenza di mutazioni in regioni diverse del genoma virale. In soggetti con MD, infatti, è sicuramente avvenuta una variazione genetica a livello della regione codificante per la proteina non strutturale NS2/3 che ha trasformato il ceppo non citopatogeno in citopatogeno

Il sequenziamento di un numero cospicuo di cloni della regione 5'UTR ha mostrato la presenza di 3 varianti con un nucleotide di differenza ciascuna; una delle due mutazioni da noi evidenziate era già stata riportata in un precedente lavoro (Jones *et al.*, 2002), tale sostituzione si è dimostrata “innocua” non causando cambiamenti funzionali della regione interessata. Anche sulla base dell'analisi della struttura secondaria da noi condotta, le mutazioni osservate non alterano la struttura secondaria permettendo alla regione di mantenere a pieno la sua funzionalità. Il significato di queste mutazioni resta comunque da chiarire, anche se si può supporre che, vista l'importanza di questa regione ai fini della replicazione virale, solo le varianti portatrici di mutazioni che non alterino la funzionalità stessa della regione riescano a moltiplicarsi.

Per quanto riguarda la regione E2 non è stato possibile evidenziare varianti virali nei cloni analizzati, questo risultato può essere imputato a vari fattori: la prevalenza delle varianti potrebbe essere, infatti, più bassa rispetto alla regione 5'UTR e quindi potrebbe essere necessario analizzare un numero più ampio di cloni per evidenziare la presenza di varianti. Inoltre, il frammento analizzato ha una dimensione maggiore (596 bp) rispetto a quello analizzato della regione 5'UTR (288 bp), la sensibilità della SSCP su un frammento di queste dimensioni potrebbe essere minore portando quindi alla mancata evidenziazione di mutazioni puntiformi.

La tecnica di real time PCR messa a punto per la quantificazione virale del BVDV, tramite un plasmide appositamente allestito mediante clonazione di un frammento della regione 5'UTR, si è rilevata capace di evidenziare fino a 10-20 copie di DNA/μl con un coefficiente di variabilità che varia dal 1,2% al 3,8% in dipendenza dalla concentrazione di DNA.

La quantificazione della carica virale e delle citochine è stata normalizzata dividendo i valori ottenuti in real time PCR per i valori del gene housekeeper GAPDH per ridurre la variabilità del dato dovuta al processo di estrazione, retrotrascrizione e trattamento con DNase cui sono stati sottoposti tutti i campioni analizzati (Bustin, 2000).

I risultati ottenuti confermano l'effetto immunodepressivo esercitato dal BVDV; negli organi linfoidi di soggetti PI, infatti, è stata chiaramente evidenziata una down-regulation delle due citochine analizzate, in particolar modo di IFN- γ .

Il ruolo di questa citochina in soggetti immunotolleranti e persistentemente infetti non è stato finora del tutto chiarito; la maggior parte delle ricerche, infatti, riguardano l'immunodepressione esercitata dal BVDV in corso di infezione acuta e valutano l'azione del virus sulle varie componenti cellulari, mentre scarsa attenzione è stata rivolta ai mediatori immunitari, quali appunto le citochine, coinvolti a monte della risposta immunitaria dell'ospite e responsabili dell'azione effettrice delle varie cellule immunitarie. Il ruolo dell'INF- γ sembra inoltre rivestire un ruolo secondario nel fenomeno dell'immunotolleranza la cui insorgenza sembra piuttosto dovuta all'azione di INF tipo I (Schweizer M., Peterhans E., 2001).

La nostra indagine ha dimostrato una differenza statisticamente significativa tra l'espressione di INF- γ negli organi di soggetti PI e soggetti sani. Tale risultato può essere spiegato dal fatto che proprio per il fenomeno dell'immunotolleranza il virus non viene riconosciuto come tale, poiché è venuto in contatto con il sistema immunitario del feto al momento dello sviluppo (45°-175° giorno di gestazione), e quindi durante la vita dell'animale, non si innesca uno stato antivirale spiegato proprio dall'INF- γ ; normalmente infatti ogni sostanza riconosciuta come non self dai linfociti T porta alla produzione di INF- γ da parte delle cellule natural killer (NK) (Billiau e Vandebroek, 2001).

Non è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa, invece, per quanto riguarda l'espressione di IL-8 negli organi dei soggetti sani e malati.

Una delle funzioni principali dell'IL-8 è quella di esercitare un'azione chemiotattica nei confronti dei neutrofili e di inibire la proliferazione delle cellule del midollo; l'infezione dei neutrofili da parte del BVDV come dimostrato da Potgerier *et al.*, (1995) determina una diminuzione della loro funzionalità, tuttavia in corso di infezione da BVDV non si assiste ad un aumento della componente neutrofilica imputabile ad una maggiore espressione di IL-8. Inoltre l'IL-8 viene soprattutto prodotta durante processi infiammatori acuti (Iisaza e Matsushima, 2001).

Il riscontro della correlazione tra la carica virale e l'espressione genica di IL-8 e IFN- γ , contribuisce a meglio interpretare il ruolo di queste molecole immunomodulatrici in corso di infezione persistente da BVDV in quanto circa il 60% della loro espressione

negli organi linfoidi si dimostra essere influenzata dalla carica virale. È comunque da evidenziare che, nel nostro studio, le differenze nella quantità di virus tra i vari distretti anatomici esaminati, pur evidenti, non sono state supportate da significatività statistica e, pertanto, non in grado di giustificare una relazione tra il tropismo del virus per un determinato distretto e la comparsa d'infezioni secondarie catalizzate dall'effetto immunodepressivo.

L'andamento della viremia in un soggetto PI è stata valutata per un periodo di 19 mesi. Nonostante i livelli di viremia in soggetti PI siano stati oggetto di studio (Brock *et al.*, 1990), ci sono poche informazioni disponibili sulla variabilità o stabilità della viremia in soggetti PI nel tempo.

La scelta di valutare tale parametro, prendendo come campione di partenza il buffy coat piuttosto che il siero dell'animale, è dovuta al fatto che cambiamenti sensibili del livello di viremia si possono verificarsi nel siero dell'animale per la produzione di Ab neutralizzanti (Brock *et al.*, 1998). La spiegazione dell'insorgenza di tale risposta immunitaria in un soggetto PI può essere ricondotta ad una esposizione a un virus antigenicamente diverso da quello infettante.

Tuttavia anche l'utilizzo di un substrato di partenza, come il buffy coat, per l'estrazione dell'RNA virale ha determinato oscillazioni statisticamente significative del livello di viremia durante il periodo di monitoraggio dell'animale. Lo studio ha quindi evidenziato che anche a carico del buffy coat possono verificarsi fluttuazioni della viremia.

L'espressione di INF- γ dal buffy coat in 3 tempi sperimentali su 10 avvalorava l'ipotesi per cui nei soggetti PI non ci sia uno stato antivirale in corso e che la deplezione dei linfociti CD4⁺ e CD8⁺ porti ad una diminuzione dell'espressione di tale citochina (Brodersen e Kelling, 1999). Tuttavia, a differenza dei risultati ottenuti sugli organi di soggetti PI e sani, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa a livello del buffy coat.

Per quanto riguarda la valutazione dell'andamento delle citochine, solo per l'IL-8 è stato possibile evidenziare l'espressione tramite real time PCR in tutti i tempi sperimentali. Come nell'indagine effettuata sugli organi, anche in questo caso l'espressione di tale citochina non è risultata statisticamente significativa nei linfociti ematici del soggetto PI e nei soggetti sani.

L'IL-1 β è di norma espressa minimamente e test altamente sensibili per il ritrovamento di IL-1 β nell'uomo sono in grado di rilevare meno di 10pg/mL; tale citochina svolge un ruolo importante nella risposta infiammatoria e induce la sintesi epatica di proteina di fase acuta (Dinarelli, 2001). Il fatto che nei tempi sperimentali 3M e 5M, la viremia del soggetto PI subisca un decremento potrebbe essere imputabile al fatto che proprio in questi due tempi sperimentali si abbia un incremento dell'espressione di questa citochina.

L'espressione dell'IL-10 è stata apprezzata solo nei tempi sperimentali 13 e 15 mentre non è stata rilevata nei soggetti sani. Tale citochina modula l'espressione di altre citochine e mediatori solubili, in particolare l'IL-10 svolge un'azione fortemente inibitoria su diverse fattori tra i quali l'IL-1 β (de Waal Malefyt, 2001). La riduzione dell'espressione di IL-1 β dal 13°M potrebbe essere correlata all'espressione proprio in quel tempo di campionamento dell'IL-10.

5. CONCLUSIONI

La caratterizzazione genetica è il mezzo col quale si può avere una visione dell'evoluzione virale, soprattutto per i virus che mutano velocemente come gli RNA virus e, in particolare, per il BVDV. Attualmente sono riportate diverse segnalazioni sulla distribuzione del BVDV in Europa, USA e in altri Paesi. Lo studio di epidemiologia molecolare svolto sul territorio italiano, ha mostrato un aumento di varianti soprattutto in alcune regioni. Tale risultato è fondamentale per valutare l'attuazione di programmi di controllo; in particolare l'evidenza di virus appartenenti a nuovi sottogruppi sottolinea l'importanza di una continua indagine di epidemiologia molecolare come base per il controllo del BVDV e per stabilire efficaci misure di profilassi. Un monitoraggio continuo con lo scopo di evidenziare i soggetti PI all'interno dell'allevamento e la circolazione del virus all'interno del territorio rappresentano dunque i mezzi indispensabili per contrastare questa malattia.

La tecnica SSCP si è dimostrata estremamente sensibile permettendo di evidenziare anche una sola sostituzione nucleotidica in un frammento di 288 bp della regione 5'UTR. La capacità del BVDV di "ignorare" le mutazioni a carico di strutture importanti per la replicazione virale come l'IRES, rappresenta un'ulteriore dimostrazione della grande capacità di adattamento del virus e della sua estrema versatilità che gli permette di sfruttare i grandi vantaggi della variabilità genetica in ospiti non persistentemente infetti ed i vantaggi dell'immunotolleranza in ospiti persistentemente infetti. L'utilizzo di tale tecnica ha permesso inoltre di evidenziare variabilità virale della regione E2 in alcuni organi anche se non a carico dei cloni da essi ottenuti; sarà fondamentale evidenziare ed analizzare le varianti presenti per questa regione per valutare se le mutazioni nucleotidiche siano non sinonime, portando quindi a cambi aminoacidici influenzanti la struttura antigenica, oppure, se si tratti di mutazioni sinonime non apportando quindi variazioni antigeniche. In tal caso, in analogia con la regione 5'UTR, queste mutazioni assumerebbero un ruolo di minore importanza dal punto di vista evolutivo.

Il ruolo esercitato dal BVDV sul sistema immunitario dell'ospite rappresenta un campo di indagine innovativo e in continua evoluzione; la comprensione della risposta immunitaria dell'ospite nei confronti del virus è importante per meglio chiarire il fenomeno dell'immunotolleranza e della persistenza del virus tipico del BVDV ed è

fondamentale per l'allestimento di nuovi ed efficaci vaccini. In particolare lo studio effettuato dimostra come sia importante valutare anche l'espressione delle citochiniche nella valutazione della risposta immunitaria.

BIBLIOGRAFIA

Achenbach J.E., Topliff C.L., Vassilev V.B., Donis R.O., Eskridge K.M., Kelling C.L. (2004). Detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus using real-time quantitative RT-PCR and quantitative competitive RT-PCR assays. *J. Virol. Methods* **121** (1), 1-6.

Adler B., Adler H., Pfister H., Jungi T.W., Peterhans E. (1997). Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. *J. Virol.* **71**, 3255-3258.

Archbald L.F., Zemjanis R. (1977). Intrauterine infusion of the virus of bovine virus diarrhea and artificial insemination in the cow at estrus. *Vet. Med. Sm. Clin.* **72**, 221-225.

Arnal M., Fernandez-de-Luco D., Riba L., Maley M., Gilray J., Willoughby K., Vilcek S., Nettleton P.F. (2004). A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *J. Gen. Virol.* **85**, 3653-7.

Audet S., Crim R., Beeler J. (2000). Evaluation of vaccines, interferons and cell substrates for pestivirus contamination. *Biologicals* **28**, 41-6.

Avellini G., Castrucci G., Morettini B., Cilli V. (1968). Bovine virus diarrhea in Italy. Reproduction of disease. *Arch.Ges.Virus Forsch* **24**, 65.

Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H.J., And Becher P. (2001). Evidence for the Presence of Two Novel Pestivirus Species. *Virology* **286**, 456-465.

Baginski S.G., Pevear D.C., Seipel M., Sun S.C.C., Benetatos C.A., Chunduru S.K., Rice C.M., Collett M.S. (2000). Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7891-7986.

Baker J.C. (1987). Bovine Viral Diarrhea Virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**, 1449-1458.

Baker C. J. (1995). The Clinical Manifestation of Bovine Viral Diarrhea Infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **11**, 425-445.

Baradel J. M., Barrat J., Blancou J., Boutin J. M., Chastel C., Dannacher G., Kihm U., Larenaudie B., Le Goff C., Pastoret P. P., Perreau P., Schwers A. Thiry E., Trap D., Uilenberg G., Vannier P. (1988). Results of a seroological Survey of Wild Mammals in France. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **7** (4), 873-883.

Baroth M., Orlich M., Thiel H.J., Becher P. (2000). Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virol.* **278**, 456-466.

Barret M.W., Chalmers G.A. (1975). A serologic survey of pronghorns in Alberta e Saskatchewan. *J. Wildl. Dis.* **11**, 157-163.

Baule C., Van Vuuren M., Lowings J. P., Belak S. (1997). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhea viruses isolated in Southern Africa. *Virus Res.* **52**, 205-220.

Baule C., Kulcsar G., Belak K. et al. (2001). Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of Bovine Viral diarrhea Virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 146-153.

Baxi M., Mcrae D., Baxi S., Greiser-Wilke I., Vilcek S., Amoako K., Deregt D. (2006). A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses. *Vet. Microbiol.* **116**, 37-44.

Becher P., Koning M., Paton D. J., Thiel H-J (1995). Further characterization of border disease virus isolates: Evidence for the presence of more than three species within the genus Pestivirus. *Virol.* **209**, 200-206.

Becher P., Orlich M., Shanon A.D., Horner G., Koning M., Thiel H.J. (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.*, **78**, 1357-1366.

Becher P., Orlich M., Thiel H. J. (1998). Ribosomal S27a Coding Sequence Upstream of Ubiquitin Coding Sequence in the Genome of a Pestivirus. *J. Virol.* **72**, 8697-8704.

Becher P., Orlich M., Kosmidou A., Baroth M., Thiel H.J. (1999). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implication for classification. *Virol.* **262**, 64-71.

Becher P., Orlich M., Thiel H. (2000). Mutations in the 5' nontranslated region of Bovine Viral Diarrhea Virus result in altered growth characteristics. *J. Virol.* **74**, 7884-7894.

Becher P., Ramirez R.A., Orlich M., Rosales S.C., König M., Schweizer M., Stalder H., Schirmer H. E Thiel H.J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* **311**, 96-104.

Beer R., Wolf G., Kaaden O.R. (2002). Phylogenetic analysis of 5' UTR region of German BVDV type II isolates. *J. Vet. Med.* **49**, 43-47.

Beherens S.E., Grassmann C.W., Thiel H.J., Meyers G., Tautz N. (1998). Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J. Virol.* **137**, 33-38.

Bhudevi, B., Weinstock, D. (2001). Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microb.* **83**, 1-10.

Bielefeldt-Ohmann H. (1995). The Pathologies of Bovine Viral Diarrhea Virus Infection. A Window on the Pathogenesis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **11**, 447-475.

Billiau A., Vandenbroeck K. (2001). Cytokine reference. Volume 1: ligands. Academic press pagg: 641-687.

Biuk-Rudan N., Cvetnic S., Madic J., Rudan D. (1999). Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology* **51**, 875-881.

Blancou J., Barrat J. (1984). Phatologie des ongules sauvages de France. Bilan de recherches recentes. *Gabier Faune Sauvage* **4**, 87-95.

Blas-Machado U., Saliki J.T., Duffy J.C., Caseltine S.L. (2004). Mar. Bovine Viral Diarrhea Virus type 2 – induced meningoencephalitis in a heifer. *Vet. Pathol.* **41** (2), 190-194.

Bolin SR, Ridpath JF. (1989). Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhea virus vaccines. *Am J Vet Res.* **50** (6), 817-21.

Bolin S. R. (1995). Control of Bovine Viral Diarrhea Infection by Use of Vaccination. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **11**, 615-625.

Bolin S.R., Ridpath J.F. (1996). Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease. *Arch. Virol.* **141**, 1463-1477.

Bolin S.R., Ridpath J.F. (1998) Prevalence of bovine viral diarrhea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum . *J.Vet.Diagn. Invest.* **10** (2), 135-139.

Bolin, S.R., Grooms, D.L. (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Veterinary Clinics North America Food Animal Practice* **20**, 51-68.

Branza-Nichita N., Durantel D., Carrouée-Durantel S., Dwek R.A., Zitzmann N. (2001). Antiviral effect of N-butyldeoxynoyirimycin against bovine viral diarrhea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers. *J. Virol.* **75**, 3527-3536.

Brock K. V. Redman D.R., Vickers M.L., Irvine N.E. (1990). Quantitation of bovine viral diarrhea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. *J. Vet. Diagn. Invest.* **3**, 99-100.

Brock K. V. (1995). Diagnosis of Bovine Viral Diarrhea Virus Infections. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **11**, 549-561.

Brock K. V. Grooms D.L., Ridpath J., Bolin S.R. (1998). Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* **10**, 22-26.

Brock K.V., Cortese V.S. (2001). Experimental fetal challenge using type 2 Bovine Viral Diarrhea Virus in cattle vaccinated with modified-live virus vaccine. *Vet. Ther.* **2**, 354-360.

Brodersen B.W., Kelling C.L. (1999). Alteration of leukocyte populations in calves concurrently infected with bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus. *Viral Immunol.*, **12**(4), 323-334.

Broes A., Wellemans G., Dheedene J. (1992). Syndrome hémorragique chez des bovins infectés par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD/MD). *Ann. Med. Vet.* **137**, 33-38.

Brown T.T., De Lahunte A., Scott F.W., Kahrs R.F., McEntee K., Gillespie J.H. (1973). Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. II. Histopathology of cerebellar degeneration (hypoplasia) induced by the virus of bovine viral diarrhea-mucosal disease. *Cornell. Vet.* **63**, 561-78.

Brown GB., Bolin SR., Frank DE., Roth JA. (1991). Defective function of leukocytes from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus, and the influence of recombinant cytokines. *Am J Vet Res.* **52**:381-387.

Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J. (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* **114**, 535-536.

Brownlie J., Clarke M. C., Howard C.J. (1987). The pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection in cattle. *Ann. Rech. Vet.* **18**, 157-166.

Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J. (1989). Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Res. Vet. Sci.* **46**, 307-311.

Brownlie J. (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech. OIE* **9**, 43-59.

Bruschke C., Van Oirschot J.T., Van Rijn P.A. (1999). An experimental multivalent bovine virus diarrhoea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine* **17**, 1983-1991.

Bukhtiyarova M., Rizzo C.J., Kettner C.A., Korant B.D., Scarnati H.T., King R.W. (2002). Inhibition of the Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine protease by a boron-modified peptidyl mimetic of its natural substrate. *Antiviral Chem. Chemoter.* **12**, 367-373.

Buckwold VE, Beer BE, Donis RO. (2003). Bovine viral diarrhoea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Review. Antiviral Res.* **60** (1):1-15.

Bustin S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.*, **25**(2):169-93.

Castrucci G., Scatozza F., Cilli V., Benimeo N., Valente C. (1968). The incidence and distribution of bovine viral diarrhea neutralizing antibodies in the serum of cattle in Italy. *Boll. Ist. Sierter*, Milan **47**, 352.

Castrucci G. (1992). Diarrea Virale del Bovino / Malattia delle Mucose. Da “Togaviridae Flaviviridae Toroviridae”, in “ *Infezioni da Virus degli Animali Domestici*”, Vol. **3**, 120-212. Eds. *Esculapio Editrice*, Bologna.

Castrucci G., Frigeri F., Martin W.B., Salvatori D., Ferrari M., Barreca F. (1998). Indagini sierologica in allevamenti bovini da carne riferita ai più diffusi agenti virali. *Large Anim.Rev.* **4**, 43-50 .

Cavirani S., Allegri G., Foni E., Chiocco D., Boldini M., Cavalca M., Flammini C. F., Galvani G. (1995). Indagine sulla Diffusione di Virus Diversi in Allevamenti di Bufale da Latte nel Nord Italia. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, Vol. **XXVII**, 243-251.

Cavirani S., Luini M., Allegri G., Fabbri M., Bottarelli E., Flamini C. F. (1992). Un Decennio di Ricerche Sierologiche sulla Diffusione di Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) e Bovid Herpesvirus 4 (BHV-4). *Sel. Vet.* **33**, 459-467.

Cavirani S., Allegri G., Donofrio G., Cabassi C. S., Ceccato C., Ballottin M., Galvani G., Taddei S. (1999). Anticorpi Verso Bovine Viral Diarrhea Virus in Bovini da Carne Allevati in Nord Italia. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, Vol. **XXXI**, 303-309.

Cavirani S., Cabassi C. S., Donofrio G., Taddei S., Bertoli M., Flammini C. F. (2000). Studio sulla Prevalenza di Infezione Persistente da Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in Bovini Allevati Intensivamente. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, Vol. **XXXII**, 293-298.

Callahan J.D., Brown F., Osorio F.A., Sur J.H., Kramer E., Long G.W., Lubroth J., Ellis S.J., Shoulars K.S., Gaffney K.L., Rock D.L., Nelson W.M. (2002). Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *J Am Vet Med Assoc.* **220**(11), 1636-42.

Chandra S., Groener A., Feldman F. (2002). Effectiveness of alternative treatments for reducing potential viral contaminants from plasma-derived products. *Thromb. Res.* **105**(5), 391-400.

Charleston B., Fray M.D., Baigent S., Carr B.V., Morrison W.I. (2001). Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol.* **82**, 1893-97.

Chase C.C.L., Elowalid G., Yousif A.A.A. (2004). The Immune Response to Bovine Viral Diarrhea Virus: A Constantly Changing Picture. *Vet. Clin. North Am Food Anim Pract.* **20** (1), 95-113.

Chastant S., Maillard R. (2000 a). BVD ed Embryo transfert nella Specie Bovina. *Summa* **7**, 27-33.

Chastant S., Maillard R. (2000 b). BVD e Turbe della Riproduzione. *Summa* **7**, 7-15.

Chaston T.B., Lidbury B.A. (2001). Genetic “budget” of viruses and the cost to the infected host: a theory on the relationship between the genetic capacity of viruses, immune evasion, persistence and disease. *Immunology and Cell Biology* **79**, 62-66.

Ciulli S. (2001). Diarrea virale bovina/Malattia delle mucose Una patologia in continua evoluzione. *Il progresso Veterinario* **5**, 233-237.

Ciulli S., Galletti E., Bonato A., Battilani M., Scagliarini A., Prosperi S. (2004). Bovine Diarrhea Virus (BVDV) variability in Persistent Infected and Mucous Disease affected cattle. *4th National Congress of the Italian Society of Virology*, Orvieto, 20-22 Settembre.

Collen T., Morrison W.I. (2000). CD4+ T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res.* **67**, 67-80.

Collet M.S., Larson R., Gold C., Strik D., Anderson D.K., Purchio A.F. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the Pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Viol.* **165**, 191-199.

Collins M.E., Desport M., Brownlie J. (1999) Bovine Viral Diarrhea Virus Quasispecies during Persistent Infection. *Virology* **259**, 85-98.

Corapi W.V., Elliot R.D., French T.W., Arthur D.G., Bezek D.M., Dubovi E.J. (1990) Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *JVMA* **196**, n.4, 590-596.

Cordioli P., Sala G., Callegari S., Olzi E., Bortolotti E. (1996). Animali BVD-Immunotolleranti Destinati ai Centri F. A.: Sei Anni di indagini nel Centro Genetico ANAFI. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, Vol. **XXVIII**, 167-172.

Cortese V. S., West K. H., Hassard L. E., Carman S., Ellis J. A. (1998). Clinical and Immunologic Response of Vaccinated and Unvaccinated Calves to Infection with a Virulent Type-II Isolate of Bovine Viral Diarrhea Virus. *J. Am. Vet. Assoc.* **213**, 1312-1319.

Couvreux B., Letellier C., Collard A., Quenon P., Dehan P., Hamers C., Pastoret P.P., Kerkhofs P. (2002). Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Research* **85**, 17-28.

Darbyshire J.H. (1960). A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Vet. Rec.* **72**, 331.

Dean H.J., Leyh R. (1999). Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge. *Vaccine* **17**, 1117-1124.

Dehan P., Hamers C., Letellier C., Couvreur B., Kerkhofs P., Pastoret P-P. (2001). Avancées récentes en biologie moléculaire du virus de la diarrhée virale bovine. *Ann. Med. Vet.* **145**, 39-46.

Deng R., Brock K.V. (1993). 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1949-1957.

Depner K., Bauer T. H., Liess B. (1992). Thermal and pH stability of pestiviruses. *Rev. Scient. Tec. Off. Int. Epiz.* **11**, 885-893.

Dinarello C. (2001). Cytokine reference. Volume 1: ligands. Academic press pagg: 351-374..

Domingo E., Holland J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev. Microbiol.* **51**, 151-178.

Domingo E. (1999). Quasispecies. In Granoff A, Webster RG (eds) *Encyclopedia of virology*. Academic Press, London, 1431-1436.

Domingo E. (2000). Virus at the edge of adaptation. *Virology* **270**, 251-253.

Done JT., Terlecki S., Richardson C. (1980). Bovine virus diarrhea-mucosal disease virus: Pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet Res.* **106**, 473-479.

Donis R.O., Dubovi E.J. (1987). Characterization of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *J. Gen. Virol.* **68**, 1597.

Donis R. O., Corapi W., Dubovi E. J. (1988). Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **69**, 77-86.

Donis R.O. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **11**, 393-423.

Douart A., Simon A. (1997). Diagnostic et controle de l'infection par le BVDV. *Point Vet.* **28**, 15-23.

Doyle L. G., Heuschele W.P. (1983). BVDV infection in captive exotic ruminants. *Javma* **183**, 1257-1259.

Drake J.W. Holland J.J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **96**, 13910-13913.

Dünser M., Altmann M., Schweighardt H., Loitsch A. (1999). Applicability of One Tube RT-PCR for detection of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in Routine Laboratory Diagnosis. *Wien Tierärzts. Mschr.* **86**, 357-366.

Durantel D., Branza-Nichita N., Carrouée-Durantel S., Butters T., Dwek R.A., Zitzmann N. (2001). Study of the mechanism of antiviral action of iminosugar derivatives against bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **75**, 8987-8998.

Ellis J., West K., Cortese V., Knooby C., Weigel D. (2001). Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against Bovine Viral Diarrhea Virus type II in young calves. *J. Am Vet. Med. Assoc.* **219**, 351-6.

Eigen M. (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Die Naturwissenschaften.* **58**, 456-523.

Eigen M., Schuster P. (1977). The hypercycle, a principle of natural selforganization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Die Naturwissenschaften.* **64**, 541-565.

Edwards S., Paton D. (1995). Antigenic difference among pestivirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **11**, 563-577.

Edwards S., Sands J.J., Harkness J. W. (1988). The application of monoclonal antibody panels to characterise pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. *Arch. Virol.* **102**, 197-206.

Elbers K., Tautz N., Becher P., Stoll D., Rumenaff T., Thiel H.J. (1996). Processing in the Pestivirus E2-NS2 Region: Identification of Proteins p7 and E2p7. *J. Virol.* **70**, 4131-4135.

Espinasse J., Parodi A.L., Constantin A., Viso M., Laval A. (1986). Hyena disease in cattle: A review. *Vet. Rec.* **118**, 328-330.

Evermann, J.F., Ridpath, J.F. (2002). Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhea virus in the northwestern United States. *Veterinary Microbiology* **89**, 129-139.

Fairbanks K., Schnackel J., Chase C.C. (2003). Evaluation of a modified live virus type-1a bovine viral diarrhea virus vaccine (Singer strain) against a type-2 (strain 890) challenge. *Vet Ther. Spring.* **4**(1), 24-34.

Falcone, E., Cordioli, P., Tarantino, M., Muscillo, M., La Rosa, G., Tollis, M. (2003). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus in Italy. *Veterinary Research Communications* **27**, 485-94.

Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (2005). Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on taxonomy of viruses. *Elsevier Academic Press*, 988-992.

Farina R., Scatozza F. (1998). Trattato di malattie infettive degli animali. *Ed. UTET*, Torino.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.

Felsenstein J. (2001). Phylogenetic Inference Package 3.6 (alpha3). *Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.*

Flint s. J., Enquist L.W., Krug R.M., Racaniello V.R., Skalka A.M. (2000). *ASM Press American society for Microbiology, Washington DC.* 478-516.

Foster Ap, Houlihan M, Higgins Rj, Errington J, Ibata G, Wakeley Pr. (2005) BVD virus in a British Alpaca *Vet Rec.* **28**,156(22) 718-9.

Fray M. D., Prentice H., Clarke M. C., Charleston B. (1998). Immunohistochemical Evidence for the Localization of Bovine Viral Diarrhea Virus, a Single-Stranded RNA Virus, in Ovarian Oocytes in the Cow. *Vet. Pathol.* **35**, 253-259.

Fray M. D., Mann G. E., Clarke M. C., Charleston B. (1999). Bovine Viral Diarrhea Virus: Its Effects on Estradiol, Progesterone and Prostaglandin Secretion in the Cow. *Theriogenology* **51**, 1533-1546.

Fredriksen B., Press C.M., Sandvik T., Odegaard S.A., Loken T. (1999). Detection of Viral antigen in placenta and fetus of Cattle Acutely Infected with Bovine Viral diarrhea virus. *Vet. Pathol.* **36**, 267-275.

Frey HR, Eicken K, Grummer B, Kenkies S, Oguzoglu TC, Moennig V. (2002). Foetal protection against bovine virus diarrhoea virus after two-step vaccination. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* **49**(10):489-93.

Fulton R.W., d'Offay J.M., Saliki J.T., Burge L.J., Helman R.G., Confer A.W., Bolin S.R., Ridpath J.F. (1999) Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for typing ruminant pestiviruses: bovine viral diarrhea viruses and border disease virus. *Can J Vet Res.* **63**(4), 276-81.

Fulton, R.W., Ridpath, J.F., Salikim, J.T., Briggs, R.E., Confer, A.W., Burge, L.J., Purdy, C.W., Loan, R.W., Duff, G.C., Payton, M.E. (2002). Bovine viral diarrhea

virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *The Canadian Journal of Veterinary Research* **66**, 181-190.

Fulton, R.W., Ridpath, J.F., Confer, A.W., Saliki, J.T., Burge, L.J., Payton, M.E. (2003). Bovine viral diarrhea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals* **31**, 89-95.

Fusco G., Guarino A. (1997). Diarrea virale del bovino malattia delle mucose. *Obiettivi & Documenti Veterinari* **11**, 39-46.

Giangaspero M., Vacirca G., Buettner M., Wolf G., Vanopdenbosh E., Muyldermans G. (1993). Serological and antigenical findings indicating pestivirus in man. *Arch. Virol.*, (suppl) **7**, 53-62.

Giangaspero M., Wellemans G., Vanopdenbosh E., Belloli A., Verhulsta. (1988). Bovine viral diarrhoea. *Lancet* ii, 110.

Giangaspero M. E Harasawa R. (1999). Ovine pestiviruses: their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions. *Veterinary Microbiology* **70**, 33-39.

Giangaspero M., Harasawa R. (2004). Genetic Variety of Bovine viral diarrhea virus 2 Strain Isolated from sheep. *Journal of Veterinary Medical Science* **66** (3), 323-326.

Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. (1996). A novel method for realtime quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**, 995–1001.

Gil L.H., Ansari I.H., Vassilev V., Liang D., Lai V.C., Zhong W., Hong Z., Dubovi E.J., Donis R.O. (2006). The Amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus NP^{ro} protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *Journal of Virology*, **80** (2), 900-911.

Gilbert S. A., Burton K. M., Prins S.E., Deregt D. (1999). Typing of Bovine Viral Diarrhea Viruses Directly from Blood of Persistently Infected Cattle by Multiplex PCR. *J., Clin. Microbiol.* **37**, 2020-2023.

Gillespie J., Baker J.A., Mcentee K. (1960). A citopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet.* **50**, 73.

Gillespie J., Coggins L., Thompson J. (1961). Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease. *Cornell Vet.* **51**, 155.

Givens M.D., Stringfellow D.A., Dykstra C.C., Riddell K.P., Galik P.K., Sullivan E., Robl J., Kasinathan P., Kumar A., Boykin D.W. (2004). Prevention and elimination of Bovine Viral Diarrhea virus Infections in Fetal fibroblast cells. *Antiviral Res.* **64**, 113-118.

Glew E.J., Carr B.V., Brackenbury L.S., Hope C., Charleston B., Howard C.J. (2003). Differential Effects of bovine viral diarrhoea virus on monocyte and dendritic cells. *J. Gen. Virol.* **84** (7), 1771-80.

Grassman C.W., Yu H., Isken O., Behrens S.E (2005). Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhea virus considerably differ in the functional organisation of the 5' non translated region: implication for the viral life cycle. *Virology* **333**, 349-366.

Grooms D. L. (1998a). Role of Bovine Viral Diarrhea Virus in the Bovine Respiratory Disease Complex. *Bovine Pract.* **32.2**, 7-12.

Grooms D. L., Brock K., Howard A. (1998b). Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in the Ovaries of Cattle Acutely Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* **10**, 125-129.

Grooms D. L., Brock K. V., Pate J. L., Day M. L. (1998c). Changes in Ovarian follicles Following Acute Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Theriogenology* **49**, 595-605.

Grooms D.L. (2004). Reproductive consequences of infection with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet. Clin. North Am Food Anim Pract.* **20** (1), 5-19.

Grummer B., Beer M., Liebler-Tenorio E., Greiser-Wilke I. (2001). Localisation of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Of general Vir.* **82**, 2597-2605.

Grummer B., Grotha S., Greiser-Wilke I. (2004). Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis, *Journal of Veterinary Medicine* **51**, 427-432.

Guenzi S. (2000) le analisi post-PCR. *Laboratorio*, 76-86.

Gunn H. M. (1993). Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* **132**, 584-585.

Hall, T.A., (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.

Hamblin C., Hedger R.S. (1979). The prevalence of antibodies to bovine virale diarrhoea/mucosal disease virus in African wildlife. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **2**, 295-303.

Hamers C., Dehan P., Couvreur B., Letellier C., Kerkhofs P., Pastoret P.-P. (2001). Diversity among bovine pestiviruses. *The Veterinary Journal.* **161**, 112-122.

Hamers C., di Valentini e., Lecomte C., lambot M., Joris E., Genicot B. et al. (2000) Virus neutralizing antibodies against a panel of 18 BVDV isolates in calves vaccinated with Rispoval RS-BVD. *J Vet Med B Infect Dis vet Public Health.* **47**, 721-726.

Hurtado, A., Garcia-Perez, A.L., Aduriz, G., Juste, R.A. (2003). Genetic diversity of ruminant pestiviruses in Spain. *Virus Research* **92**, 67-73.

Harpin S., Hurley D.J., Mbikay M., Talbot B., Elazha R.Y. (1999). Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2. *J. Of Genaral Virology* **80**, 3137-3144.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986–994.

Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. (2006) A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods.* **136**(1-2), 200-9.

Houe H., Meyling A. (1991). Prevalence of BVD in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev. Vet. Med.* **11**, 9-16.

Houe h. (1995). Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **11**, 521-547.

Houe H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* **64**, 89-107.

Houe, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* **31**, 137-143.

Howard C. J., Clarke M. C., Sopp P., Brownlie J. (1992). Immunity to bovine viral diarrhoea virus in calves: The role of different T-cell subpopulation analyzed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **32**, 303-314.

Hult L., Lindberg A. (2005) Experiences from BVDV control in Sweden. *Prev. Vet. Med.* **72**, 143-148

Hulst M.M., Westra D.F., Wensvoort G., Moormann R.J.M. (1993). Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera virus. *J. Virol.* **67**, 5435-5442.

Hurtado A., Garcia-Perez A.L., Aduriz G., Juste R.A. (2003). Genetic diversity of ruminant pestiviruses in Spain. *Virus Res.* **92**, 67-73.

Iisaza H., Matsushima K. (2001) Cytokine reference. Volume 1: ligands. Academic press. pag: 1062-1067.

Isaacs A., Lidenmann J. (1957). Virus interference. I. Interferons. *Proc. R. Soc. Lond. B* **147**, 258.

Iqbal M., Flick-Smith H., Mccauley John W. (2000). Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. *Journ. Of General Virol.* **81**, 451-459.

Isken O., Grassman C.W., Sarisky R.T., Kann M., Zhang S., Grose F., Kao P.N., Behrens S.E. (2003). Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *EMBO Journal* **22**, 5655-5665.

Isken O., Grassmann C.W., Yu H. E Behrens S-E. (2004). Complex signals in the genomic 3'-nontranslated region of Bovine Viral Diarrhea Virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA* **10**, 1637-1652.

Kafi M., McGowan M., Jillella D. (1994). The effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) during follicular development on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology.* **41**, 41-223

Kamstrup S., Roensholt L., Jensen M.H., Dalsgaard K. (1999). Production of a highly immunogenic subunit ISCOM vaccine against Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vaccine* **17**, 1057-1064.

Karstad L. (1981). Bovine virus diarrhoea. In infectious diseases of wild mammals. (Davis, Karstad, Trainer, eds.) *Iowa State University Press*, Ames, Iowa, 2nd ed, 209-211.

Konig M., Cedillo, Rosales S., Becher P., Thiel H.J. (2003). Heterogeneity of ruminant pestiviruses: academic interest or important basis for the development of vaccines and diagnostics?. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **116**, 216-21.

Kümmerer B. M., Stoll D., Meyers G. (1998). Bovine Viral Diarrhea Virus Strain Oregon: a Novel Mechanism for Processing of NS2-3 Based on Point Mutation. *J. Virol.* **72**, 4127-4138.

Lai V., Kao C., Ferrari E., Park J., Uss A., Wright-Minogue J., Hong Z., Lau J. (1999). Mutational analysis of BVDV RNA dependent RNA polymerase. *J. Of Vir.* **73**, 10129-10136.

Lai V.C., Zhong W., Shelton A., Ingravallo P., Vassilev V., Donis R.O. hong Z., Lau J.Y. (2000). Generation and characterization of a Hepatitis C virus NS3 protease-dependent bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **74**, 6339- 6347.

Lang-Ree J. R., Vatn T., Kommisrud E., Loken T. (1994). Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Vet. Rec.* **135**, 412-413.

Lawman M.J.P., Evans D., Gibbs D.P.J., McDiarmid A., Rowe L. (1978). A preliminary survey of British deer for antibody to some virus diseases of farm animals. *Br. Vet. J.* **134**, 85-91.

Lecomte C., Navetat H., hamers C., Lambot M., Schelcher F., Cabanie P., Pastoret P. (1998). Isolamento del Virus BVD. Due Casi di Sindrome Emorragica in Bovini di Razza Charolais. *Summa* **6**, 69-72.

Lecot S, Belouzard S, Dubuisson J, Rouille Y. (2005). Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **79** (16), 10826-9.

- Lee Y-M., Tscherne D.M., Yun S-I., Frolov I. E Rice C.M.** (2005). Dual mechanisms of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication. *J. of Virology* 3231-3242.
- Lettellier, C., Kerkhofs, P.** (2003). Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of Bovine Viral Diarrhoea virus. *J. Virol. Meth.* **114**, 21–27.
- Leutenegger C.M., Alluwaimi A.M., Smith W.L., Perani L., Cullor J.S.** (2000). Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol.*, 77(3-4):275-87.
- Li Y., McNally J.** (2001). Characterization of RNA Synthesis and translation of bovine viral diarrhea virus (BVDV). *Virus Genes*, **23(2)**, 149-155
- Liang T.J., Rehermann B., Seeff L.B., hoofnagle J.H.** (2000) Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Ann. Inter. Med.* 132, 296-305
- Liang D., Sainz I.F., Ansari I.H., Gil L.H.V.G., Vassilev V. E Donis R.O.** (2003). The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J. of General Virology* 84, 1269-1274.
- Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J.F., Neill J.D.** (2003). Distribution of Viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J. Vet. Diagn. Invest.* **15**, 221-232.
- Liebler-Tenorio EM, Ridpath JE, Neill JD.** (2004). Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* **16** (5):388-96.
- Linberg A., Alenius S.** (1999). Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.* **64**, 197-222.

Liu L., Lehmkuhl H.D., Kaeberle M.L. (1999). Synergistic effects of Bovine respiratory syncytial Virus and noncytopathogenic Bovine Viral Diarrhea Virus infection on selected Bovine alveolar macrophage functions. *Can. J. Vet. Res.* **63**, 41-48.

Loken T. (1995). Ruminant pestivirus infection in animals other than cattle and sheep. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* **11**: 597-614.

Luzzago C., Piccinini R., Zepponi R., Zecconi A. (1999a). Study on Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Antibodies in 29 Italian Dairy Herds with Reproductive Problems. *Vet. Microbiol.* **64**, 247-252.

Luzzago C., Zecconi A., Casuala A., Bianconi R., Ruffo G. (1999b). Indagine in Seguito a Focolaio di Diarrea Virale Bovina Caratterizzato da Sintomatologia Emorragica. *La Selezione Veterinaria* **6**, 377-386.

Luzzago C., Bandi C., Bronzo V., Ruffo G., Zecconi A. (2001). Distribution pattern of bovine viral diarrhoea virus strains in intensive cattle herds in Italy. *Vet. Microbiol.* **83**, 265-274.

Luzzago C. (2005). La diarrea virale bovina: un problema ancora aperto. Lodi, 11 Novembre.

Makoschey B., Becher P., Janssen M.G., Orlich M., Thiel H.J., Lutticken D. (2004). Bovine viral diarrhoea virus with deletions in the 5'-nontranslated region: reduction of replication in calves and induction of protective immunity. *Vaccine*. **3**; 22(25-26), 3285-94.

Maglione D., Nebbia P., Maglione E. (1990). Sulla Diffusione del BVD in Alcune Provincie Piemontesi. *Ann. Fac. Vet. Med. Univ. Torino* **33**, anni 1988-1989-1990.

Mahony, T.J., McCarthy, F.M., Gravel, J.L., Corney, B., Young, P.L., Vilcek, S. (2005). Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. *Veterinary Microbiology* **106**, 1-6.

Maillard R., Chastant S. (2000). Metodi diagnostici e strategia di lotta per la BVD. *Summa*. **17**, 17-24.

Mainar-Jaime R.C., Berzal-Herranz B., Arias P., Rojo-Vazquez F.A. (2001). Epidemiological pattern and risk factors associated with BVDV infection in cattle in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. *Preventive Vet. Medicine* **52**, 63-73.

Marcato P. S. (2002). *Patologia sistematica comparata Eds. Ed agricole*, Bologna

Markland W., McQuaid T.J., Jain J., Kwong A.D. (2000). Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **44**, 859-866.

McClurkin A.W., Bolin S.R., Coria M.F. (1985). Isolation of cytopathic and noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* **186**, 568-569.

McGoldrick, A., Lowings, J.P., Ibata, G., Sands, J.J., Belak, S., Paton, D.J. (1998). A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). *J. Virol. Meth.* **72**, 125–135.

Mcgowan M.R., Kirkland P.D., Richards S.G., Littlejohns I.R. (1993). Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet. Rec.* **133**, 39-43.

Mendez E., Ruggli N., Collett M. S., Rice C. M. (1998). Infectious Bovine Viral Diarrhea Virus (Strain NADL) RNA from Stable cDNA Clones: a Cellular Insert Determines NS3 Production and Viral Cytopathogenicity. *J. Virol.* **72**, 4737-4745.

Meyers G., Thiel H. J. (1996). Molecular characterization of pestivirus. *Advan. virus Res.* **47**, 53-118.

Meyers G., Stoll D., Gunn M. (1998). Insertion of a Sequence Encoding Light Chain 3 of Microtubule-Associated Proteins 1A and 1B in a Pestivirus Genome: Connection with Virus Cytopathogenicity and Induction of Lethal Disease in Cattle. *J. Virol.* **72**, 4139-4148.

Mishra, N., Pattnaik, B., Vilcek, S., Patil, S.S., Jain, P., Swamy, N., Bhatia, S., Pradhan, H.K.. (2004). Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. *Veterinary Microbiology* **104**, 207-12.

Moennig V., Liess B. (1995). Pathogenesis of Intrauterine Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **11**, 477-487.

Munoz-Zanzi C., Hietala S., Thurmond M. E Johnson W. (2003). Quantification, risk factors, and health impact of natural Bovine Viral Diarrhea Virus congenital infection in dairy calves on two large California dairies. *Am. J. Vet. Res.* **64**, 358-365.

Murray R.D. (1991). Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with Bovine Viral Diarrhea Virus infection. *Arch. Virol. Suppl.* **3**, 217-224.

Nagai, M., Hayashi, M., Sugita, S., Sakoda, Y., Mori, M., Muratami, T., Ozawa, T., Yamada, N., Akashi, H. (2004). Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea viruses using five different genetic regions. *Virus Research* **99**, 103-113

Nam J.H., Bukh J., Purcell R.H., Emerson S.U. (2001). High-level expression of hepatitis C virus (HCV) structural proteins by a chimeric HCV/BVDV genome propagated as a BVDV pseudotype. *J. Virol. Methods* **97**, 113-123.

Nettleton P. F. (1990). Pestivirus Infection in Ruminants Other Than Cattle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **9**, 131-150.

Nettleton P.F., Entrican G. (1995). Ruminant Pestivirus. *Br. Vet.j.* **151**, 615-642.

Niskanen R., Alenius S., Larsson B. (1991). Determination of level of antibodies to BVDV in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of bvdv infections in dairy herds. *Arch. Virol.* (Suppl.3). 245-251.

Nijaa B.L., Clark E.G., Janzen E. Et Al. (2000). Diagnosis of persistent Bovine Viral Diarrhea Virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**, 393-399.

Nuotio L., Juvonen M., Neuvonen E., Sihvonen L., Husu-Kallio J. (1999). Prevalence and geographic distribution of bovine viral diarrhoea (BVD) infection in Finland 1993-1997 *Vet. Microbiol.* **64**, 231- 235.

Jones L.R., Zandomeni R., Weber E.L. (2002). Quasispecies in the 5' untranslated genomic region of bovine viral diarrhoea virus from a single individual *Journal of General Virology* **83**, 2161-2168.

Jones L.R., Weber E.L. (2004). Homologous recombination in bovine pestiviruses. Phylogenetic and statistic evidence. *Infect Genet Evol* **4**(4), 335-43

Odeon A.C., Kelling C.L., Marshall D.J. Et Al. (1999). Experimental infection of calves with Bovine Viral Diarrhea Virus genotype II (NY-93). *J. Vet. Diagn. Invest.* **11**, 221-228.

Odeon AC, Risatti G, Kaiser GG, Leunda MR, Odriozola E, Campero CM, Donis RO. (2003). Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Vet Microbiol* **17**, 96(2), 133-44

Olchoway T.W., Slauson D.O., Bchsler P.N. (1997). Induction of procoagulent activity in virus infected bovine alveolar macrophages and the effect of lipopolysaccharide. *Vet.Immunol Immunopath.* **58**, 27-37.

Paeshuyse J., Leyssen P., Mabery E., Boddeker N. Vrancken R., Froeyen M., Ansari I.H., Dutartre H., Rozenski J., Gil L.H.V.G., Letellier C., Lanford R., Canard B., Koenen F., Kerkhofs P., Donis R.O., Herdewijn P., Watson J., De Clercq E., Puerstinger G., Neyts J. (2006). A novel, highly selective inhibitor of pestivirus replication that targets the viral RNA-dependent RNA Polymerase. *J. Virol.* **80**, 149-160.

Parks, J. S., Moon, H.J., Lee, B.C., Hwang, W.S., Yoom, H.S., Kimm, D.Y., Park, B.K. (2004). Comparative analysis of the 5'-untranslated region of bovine viral diarrhea virus isolated in Korea. *Research in Veterinary Science* **76**, 157-163.

Pastoret P., Hamers C., Lecomte C., Lambot M. (1998). Biologia ed Epidemiologia dell'Infezione da Virus BVD/MD. *Summa* **6**, 33-37.

Paton D.J., Lowings J.P., Ramirez G.C. (1994). Stability of the gp53 gene of a bovine viral diarrhoea virus isolated at different times from a persistently infected steer. *British Veterinary Journal* **150**, 603-607.

Paton D. J., Sands J. J., Lowings J. P., Smith J. E., Ibata G., Edwards S. (1995a). A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet. Res.* **26**, 92-109.

Paton D.J., Carlsson U., Lowings J.P., Sands J.J., Vilcek S., Alenius S. (1995b). Identification of herd-specific bovine viral diarrhea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* **43**, 283-294.

Pellerin C., Hurk jan van den , Lecomte J., Tussen P. (1994). Identification of a New Group of bovine Viral Diarrhea Virus Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities. *Virol.* **203**, 260-268.

Pestova T., Christopher U.T. Hellen. (1999). Internal Initiation of Translation of Bovine Viral Diarrhea Virus RNA. *Virol.* **258**, 249-256.

Peterhans E., Jungi W.T., Schweizer M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals* **31**, 107-111.

Poli G., Cocilovo A. (1996). Microbiologia e Immunologia Veterinaria *Eds. UTET*, Torino.

Poggi A., Carboni A. (1960). La diarrea da virus dei bovini della Pianura Padana. *Se.Vet.* **1**, 281-283.

Polak M.P, Zmudzinski J. (1999). Prevalence of bovine viral diarrhea virus infectio in bulls in artificial insemination centers in Poland. *Vet. Microbiol.* **64**, 253-257.

Polak M.P, Zmudzinski J. (1995). Prevalence of bovine viral diarrhea virus in cattle population of Poland, In Proc. 3rd Congress Europ . *Soc Vet. Virol., Immunobiology of Viral infections*, Interlaken, Switzerland, 4-6 September 1994, 309-310.

Poole T., Wang C., Popp R., Potgieter L.N., Siddiqui A., Collet M.S (1995). Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virol.* **206**, 750-754.

Potgieter L.N., Mccracken M.D., Hopkins F.M., Walker R.D. (1984). Effect of Bovine Viral Diarrhea Virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am. J. Vet. Res.* **45**, 687-690.

Potgieter L.N. (1995). Immunology of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet. Clin. North Am Food Anim Pract*, **11**, 501-520.

Potts B., Sever J., Tzan N., Huddleston D., Elder G. (1987). Possible role of pestiviruses in microcephaly. *Lancet* **I**, 972.

Pratelli A., Buonavoglia C. (2000). Caratterizzazione gnomica di pestivirus isolati da agnelli e capretti. *Praxis Vet.* **21**, 2-5.

Parks J. B., England J.J. (1974). A serological survey for selected viral infections of Rocky Mountain Bighorn Sheep. *J. Wildl. Dis.* **10**, 107-110.

Ramsey F.K., Chivers W.H. (1953). Mucosal disease of cattle. *Nth Amer. Vet.* **34**, 629-633.

Rebhun w. C., french t. w., perdrizet j. A., dubovi e. j., dill s. g., karcher l. f. (1989). Thrombocytopenia Associated With Acute Bovine Virus Diarrhea Infection in Cattle. *J. Vet. Intern. Med.* **3**, 42-46.

Reid S.M., Paton D.J., Wilsden G., Hutchings G.H., King D.P., Ferris N.P., Alexandersen S. (2004) Use of automated real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to monitor experimental swine vesicular disease virus infection in pigs. *J Comp Pathol.* **131**(4),308-17.

Ridpath J.F., Bolin S.R., Dubovi E.J. (1994). Segregation of BVDV into Genotypes. *Virol.* **205**, 66-74.

Ridpath J.F., Bolin S.R. (1995). Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virol.* **212**, 259-262.

Ridpath J. F., Neill J.D., Frey M., Landgraf J.G. (2000). Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV in North America. *Vet. Microbiol.* **77**, 145-155.

Ridpath J.F. (2003). BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals* **31**, 127-131.

Risatti, G.R., Callahan, J.D., Nelson, W.M., Borca, M.V. (2003). Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 500–505

Roeder P.L., Jeffrey M., Cranwell M. (1986). Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequella with fetal maturation. *Vet Rec.* **118**, 44-48

Roeder P.L., Jeffrey M., Drew T.W. (1987). Variable nature o border disease on a single farm: the infection status of affected sheep. *Res. Vet. Sci.* **43**, 28-33.

Roehe Paulo M., Woodward M.J., Edwards S. (1992). Characterisation of p20 gene sequences from a border disease-like pestivirus isolated from pigs. *Vet. Microbiol.* **33**, 231-238.

Rossi C. (1990). Il Complesso Diarrea Virale Bovina-Malattia delle Mucose. *Obiettivi e documenti Veterinari* **9**, 17-23.

Saliki J.T. E Dubovi E.J. (2004). Laboratori Diagnosis of Bovine Viral Diarrea Virus Infections. *Vet. Clin. North Am Food Anim Pract.* **20** (1), 69-83.

Sandvik T. (1999). Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.* **64**, 123-134.

Sakoda, Y., Ozawa, S., Damrongwatanapokin, S., Sato, M., Ishikawa, K., Fukusho, A. (1999). Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestiviruses mainly isolated in Japan. *Vet. Microbiol.* **65**, 75-86.

Scarratt W.K. (2004). Cerebellar disease and disease characterized by dysmetria or tremors. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **20**(2), 275-86, vi.

Schelp C., Greiser-Wilke I., Moenning V. (2000). An actin-binding protein is involved in pestivirus entry into bovine cells. *Virus Res.* **68**, 1-5.

Schneider R., Unger G., Stark R., Schneider-Scherzer, E.& Thiel H.J. (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* **261**, 1169-1171.

Schweizer M., Peterhans E. (1999). Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J.Gen.Virol.* **80**, 1147-1155.

Schweizer M., Peterhans E. (2001). Noncytotoxic Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits Double-Stranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis. *J.Gen.Virol.* **75** (10), 4692-4698.

Sentsui H., Takami R., Nishimori T., Murakami K., Yokoyama T., Yokomizo Y. (1998) Anti-Viral effect of Interferon- α on Bovine viral Diarrhea Virus. *J. Vet. Med. Sci.* **60** (12), 1329-1333.

Simon A., Douart A. (1999). Malattia delle Mucose e Diabete Mellito in una Vitella. *Summa* **7**, 67-71.

Smith B.P. (2000). Large Animal Internal Medicine. *Eds. Mosby*, 711.

Smith D.R. E Grotelueschen D.M. (2004). Biosecurity of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet. Clin. North Am Food Anim Pract.* **20** (1), 131-149.

Stalder, H.P., Meier, P., Pfaffen, G., Wageck-Canal, C., Rufenacht, J., Schaller, P., Bachofen, C., Marti, S., Vogt, H.R., Peterhans, E. (2005). Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine* **72**, 37-41.

Stöber M. (1984). Recenti Acquisizioni sulla Sindrome da BVD del Bovino: Agente Eziologico, Aspetti Immunitari, Decorso e Diffusione, Misure di Intervento. *Praxis Vet.* **2**/1984.

Sun J.H., Lemm J.A., O'Boyle D.R., Racela J., Colonno R., Gao M. (2003). Specific inhibition of bovine viral diarrhoea virus replicase. *J. Virol.* **77**,6753-6770.

Tabarrini O., Manfroni G., Fravolini A., Cecchetti V., Sabatini S., De Clercq E., Rozenski J., Canard B., Dutartre H., Paeshuyse J., Neyts J. (2006). Synthesis and Anti-BVDV activity of acridones as new potential antiviral agents. *J. Med. Chem.* **49**, 2621-2627.

Tajima M., Yakaza T., Hagiwara K. Et Coll. (1992). Diabetes mellitus in cattle infected with bovine viral diarrhoea mucosal disease virus. *J. Vet. Med. A.* **39**, 616-620.

Tajima, M., Frey, H.R., Yamato, O., Maede, Y., Moennig, V., Scholz, H., Greiser-Wilke, I. (2001). Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Research* **76**, 31-42.

Tajima, M., Dubovi, E.J. (2005). Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhoea virus isolates from dairy operations in the United States of America. *J. Vet. Diagn. Invest.* **17**, 10-5.

Tanyima H., Ushiki T., Tajima M. Et Coll. (1995). Spontaneous diabetes mellitus associated with persistent bovine viral diarrhoea (BVD) virus infection in young cattle. *Vet. Pathol.* **32**. 221-229.

Tautz N., Thiel H. J., Dubovi E. J., Meyers G. (1994). Pathogenesis of Mucosal Disease: a Cytopathogenic Pestivirus generated by an Internal Deletion. *J. Virol.* **8**, 3289-3297.

Tautz N., Meyers G., Stark R., Dubovi E. J., Thiel H. J. (1996). Cytopathogenicity of a Pestivirus Correlates with a 27- Nucleotide-Insertion. *J. Virol.* **70**, 7851-7858.

Tautz N., Kaiser A., Thiel H.J. (2000). NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Viol.* **273**, 351-363.

Tautz N., Meyers G., Thiel H.J. (1998). Pathogenesis of mucosal disease of cattle caused by pestivirus. *Clinical and Diagnostic Virolog.* **10**, 121-127.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680

Tisato E., Demas S., Giancane M., Bartolozzi L., Zuin A., Cancellotti F. M. (2000). Approccio alla Diagnosi Biomolecolare del Virus BVD-MD. *La Selezione Veterinaria*, Suppl., 533-543

Tizard R. (2004). *Veterinary Immunology: an introduction, seventh edition.* Saunders Elsevier (USA), 281-292.

Toplak, I., Sandvik, T., Barlic-Maganja, D., Grom, J., Paton, D.J. (2004). Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Veterinary Microbiology* **99**, 175-85.

Topliff C.L., Kelling C.L. (1998). Virulence in the 5' Untranslated Region of Genotype 2 Bovine viral Diarrhea Virus Isolates. *Viol.* **250**, 164-172.

Trautwein G. (1991). La Diarrea Virale Bovina. *Obiettivi e Documenti Veterinari* **5**, 31-35.

Van Reeth K., Adair B. (1997). Macrophages and respiratory viruses. *Pathol Biol.* **45**, 184-192.

Vannier P., Carnero R. (1985). Effets pour le porc d'un virus propagé par un vaccin contre la maledie d' Aujeszky. *Le Point Vet.* **17**, 325-331.

Van Gennip H.G., Bouma A., Van Rijn P., Widjoatmodjo M.N., Moormann R.J. (2002). Experimental non-transmissible marker vaccines for CSF by trans-complementation of E^{ms} or E2 of CSFV. *Vaccine* **20** (11-12), 1544-1556.

Van Oirschot J.T. (1999). Diva vaccines that reduce virus transmission. *J Biotechnol.* **20** 73(2-3), 195-205.

Vilcek S., Herring A.J., Nettleton P.F., Lowings J.P., Paton D.J. (1994). Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* **136**, 309-323.

Vilcek S., Nettleton P.F., Paton D.J., Belak S. (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *Jou. of General Virol.* **78**, 725-735.

Vilcek S., Alenius S., Paton D.J., Mittelholner C., Belak S. (1999a). Genetic clustering of Bovine Viral Diarrhoea Viruses in Cattle Farms: Genetic Identification and Analysis of viruses Directly from Cattle Sera. *Vet. J.* **158**, 33-38.

Vilcek S., Drew., Mcgoldrick A., Paton D.J. (1999b). Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wale. *Vet. Microbiol.* **69**, 227-237.

Vilcek S., Paton D.J., Durkovic B., Strojny L., Ibata G., Moussa A., Loitsch A., Rossmanith W., Scicluna M.T., Palfi V. (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* **146**, 99-115.

Vilcek, S., Greiser-Wilke, I., Durkovic, B., Obritzhauser, W., Deutz, A., Kofer, J. (2003a). Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). *Veterinary Microbiology* **91**, 285-291.

Vilcek, S., Mojzisova, J., Bajova, V., Paulik, S., Strojny, L., Durkovic, B., Hipikova, V. (2003b). A survey for BVDV antibodies in cattle farms in Slovakia and genetic typing of BVDV isolates from imported animals. *Acta Vet. Hung.* **51**, 229-236.

Vilček Š., Durkovic B., Kolesarova M., Greiser-Wilke I., Paton D.J. (2004). Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet. Re.* **35**, 609-615.

Virakul P., Fahning ML, Joo HS, Zemjanis R. (1988) Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of Bovine Viral Diarrhoea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain. *Theriogenology*. **29** (2), 441-9.

Voges H., Horner G. W., Rowe S., Wellenberg G.J. (1998). Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viremic bull. *Vet.Microbiol.* **61**, 165-175.

Zurovac O., Stringfellow D., Brock K., Riddell M., Wright J. (1994). Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in a system for in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. **41**, 841-853

Xue W., Minocha H. C. (1993). Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.* **74**, 73-79.

Yolken R., Leister F., Almeida-Hill J. (1989). Infantile gastroenteritis associated with excretion of pestivirus antigens. *Lancet* **11**, 517-519.

Yu H., Grassmann C:W., Beherens S.E. (1999). Sequence and Structural Elements at 3' Terminus of Bovine Viral Diarrhoea Virus Genomic RNA: Functional Role during RNA Replication. *J.Virol.* **73**, 3638-3648.

Yu H., Isken O., Grassmann C.W. E Behrens S-E. (2000). A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the Bovine Viral Diarrhoea Virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J. of Virology*, 5825-5835.

Waal de Malefyt R. (2001). Cytokine reference. Volume 1: ligands. Academic press
pagg: 165-185.

Walz P. H., Baker J. C., Mullaney T. P., Keneene J. B., Maes R. K. (1999). Comparison of type 1 and type 2 bvdv infection in swine. *Can.J.Vet.Res.* **63**, 119-123.

Warillow D., Lott W.B., Greive S., Growans E.J. (2000). Properties of the bovine viral diarrhoea virus replicase in extracts of infected MDBK cells. *Arch Virol.* **145**, 2163-2171.

Wensing A.M, Boucher C.A. (2003). Worldwide transmission of drug-resistant HIV *AIDS Rev* **5**, 140-155.

Wessman S., Levings R. (1999). Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Dev. Biol. Stand* **99**, 3-8.

Whelsh M. P., Adair B. M., Foster J. C. (1995). Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions, *Vet. Immunol.* **46**, 1995-2010.

Wilke C. O. (2005). *BMC evolutionary biology.* **5**:44, 1-8.

Wilke C. O., Forster R., Novella I.S. (2006). Quasispecies in Time-Dependent Environments. *CTMI* **299**, 33-50.

Wood RD, Goens SD, Carman PS, Deregt D, Jefferson B, Jacobs RM. (2004). Effect on hematopoietic tissue of experimental infection of calves with noncytopathic type 2 bovine viral diarrhea virus. *Can J Vet Res.* **68**(1), 42-8

Zheng L., Zhang S., Xue W., Kapil S., Minocha H. C. (1998). Expression of a 50kDa Putative Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus in Bovine Fetal Tissues. *Can. J.Vet. Res.* **62**, 156-159.

Zhong W., Gustshall L.L, Del V.A. (1998). Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B of BVDV. *J.Virol.* **72**, 9365-9369.